illumina®

Guida per l'utente del sistema MiSeq®

SOLO A USO DI RICERCA

DI PROPRIETÀ DI ILLUMINA
N. codice 15027617 Rev. O ITA
N. di catalogo SY-410-9001DOC
Settembre 2014

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente all'uso conforme a contratto da parte dei clienti Illumina in correlazione con l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti con alcun mezzo, senza previa approvazione scritta da parte della Illumina. Mediante questo documento, Illumina non cede alcuna licenza protetta dai suoi diritti di brevetto, di proprietà dei marchi, di proprietà intellettuale o riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di terzi.

Il Software viene concesso in licenza conformemente alle condizioni del contratto "Illumina Sequencing Software License Agreement" fornito in un documento separato. Se l'utente non accetta le condizioni specificate in tale contratto, Illumina non concede la licenza d'uso del Software e l'utente deve astenersi dall'installare o utilizzare il Software

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE PUÒ CAUSARE DANNI AL PRODOTTO, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEI PRODOTTI QUI DESCRITTI (COMPONENTI E SOFTWARE INCLUSI) O DA QUALSIASI USO DI TALI PRODOTTI NON ESPLICITAMENTE CONTEMPLATO NELLE LICENZE SCRITTE O NELLE AUTORIZZAZIONI CONCESSE DA ILLUMINA IN OCCASIONE DELL'ACQUISIZIONE DEI PRODOTTI STESSI DA PARTE DEL CLIENTE.

SOLO A USO DI RICERCA

© 2014 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Illumina, **24sure**, **BaseSpace**, **BeadArray**, **BlueFish**, **BlueFuse**, **BlueGnome**, **cBot**, **CSPro**, **CytoChip**, **DesignStudio**, **Epicentre**, **GAIIx**, **Genetic Energy**, **Genome Analyzer**, **GenomeStudio**, **GoldenGate**, **HiScan**, **HiSeq**, **HiSeq X**, **Infinium**, **iScan**, **iSelect**, **ForenSeq**, **MiSeq**, **MiSeqDx**, **MiSeq FGx**, **NeoPrep**, **Nextera**, **NextBio**, **NextSeq**, **Powered by Illumina**, **SeqMonitor**, **SureMDA**, **TruGenome**, **TruSeq**, **TruSight**, **Understand Your Genome**, **UYG**, **VeraCode**, **verifi**, **VeriSeq**, il colore arancione zucca e il design a basi streaming sono marchi o marchi registrati di Illumina, Inc. negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, loghi e altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

Questo software contiene la libreria SeqAn, concessa in licenza a Illumina e distribuita conformente alle condizioni della seguente licenza:

Copyright © 2010, Knut Reinert, FU Berlin. Tutti i diritti riservati. Sono consentiti la ridistribuzione e l'uso nei formati sorgente e binario, con o senza modifiche, purché siano rispettate le condizioni di seguito riportate:

1 La ridistribuzione del codice sorgente deve contenere le informazioni sul copyright riportate sopra, il presente elenco di condizioni e le limitazioni di responsabilità riportate di seguito.

2 La ridistribuzione in formato binario deve contenere le informazioni sul copyright riportate sopra, il presente elenco di condizioni e le limitazioni di responsabilità riportate di seguito nella documentazione e/o in altro materiale fornito con la distribuzione.

3 I nomi "FU Berlin" e "Knut Reinert" non devono essere utilizzati per appoggiare o promuovere prodotti derivati da questo software senza previa ed esplicita autorizzazione scritta.

QUESTO SOFTWARE VIENE FORNITO DAI TITOLARI DEI DIRITTI D'AUTORE E DAI LORO COLLABORATORI "NELLO STATO IN CUI SI TROVA" SENZA ALCUNA GARANZIA ESPRESSA O IMPLICITA, INCLUSE IN VIA ESEMPLIFICATIVA, LE GARANZIE DI COMMERCIABILITÀ O IDONEITÀ A UNO SCOPO SPECIFICO. IN NESSUN CASO I TITOLARI DEI DIRITTI D'AUTORE E I LORO COLLABORATORI POTRANNO ESSERE RITENUTI RESPONSABILI DI EVENTUALI DANNI DIRETTI, INDIRETTI, INCIDENTALI, SPECIALI, ESEMPLARI O CONSEQUENZIALI, (INCLUSI, A MERO TITOLO ESEMPLIFICATIVO, I COSTI DI APPROVVIGIONAMENTO DI BENI O SERVIZI SOSTITUTIVI, I DANNI RISULTANTI DA INDISPONIBILITÀ, PERDITE DI DATI, PERDITE DI RICAVI O DA INTERRUZIONE DELL'ATTIVITÀ COMMERCIALE) INDIPENDENTEMENTE DALLA CAUSA E A PRESCINDERE DALLA INTERPRETAZIONE GIURIDICA,

CHE INVOCHI INADEMPIMENTO CONTRATTUALE, EXTRACONTRATTUALE O LA RESPONSABILITÀ OGGETTIVA (INCLUSI I CASI DI NEGLIGENZA O ALTRO) DERIVANTI DALL'UTILIZZO DEL PRESENTE SOFTWARE, ANCHE NEL CASO IN CUI SIANO STATI INFORMATI DELLA POSSIBILITÀ DEL VERIFICARSI DI TALI DANNI.

Leggere prima di usare questo prodotto

Questo prodotto, il suo utilizzo e disposizione, sono soggetti ai seguenti termini e condizioni. Se l'acquirente non concorda con questi termini e condizioni, l'acquirente non è autorizzato da Illumina ad utilizzare questo prodotto e l'acquirente non deve utilizzare questo prodotto.

1 **Definizioni**. "**PI per applicazioni specifiche**" indica diritti di proprietà intellettuale controllati o di proprietà di Illumina che riguardano questo prodotto (e il suo utilizzo) solo in relazione ad ambito/i o applicazione/i specifiche. La PI per applicazioni specifiche esclude ogni proprietà intellettuale controllata o di proprietà di Illumina relativa a elementi o caratteristiche di questo prodotto (o del suo utilizzo) che siano comuni a tutte le possibili applicazioni e a tutti i possibili ambiti di utilizzo di questo prodotto (di seguito, la "**PI base**"). La PI per applicazioni specifiche e la PI base sono sottoinsiemi separati e non coincidenti, nemmeno in parte, di tutti i diritti di proprietà intellettuale posseduti o controllati da Illumina. A titolo esemplificativo ma non esaustivo, i diritti di proprietà intellettuale di Illumina per metodi diagnostici specifici, per metodi forensi specifici, o per biomarcatori del DNA, sequenze o combinazioni di biomarcatori o sequenze specifiche sono esempi di PI per applicazioni specifiche. "**Materiali di consumo**" indica i reagenti e i materiali di consumo a marchio Illumina, destinati a essere utilizzati insieme e in combinazione con l'hardware. "**Documentazione**" indica il manuale per l'utente Illumina per questo prodotto, inclusi senza limitazioni, foglietti illustrativi e altra documentazione di accompagnamento per questo prodotto o a cui il prodotto fa riferimento o nella confezione del prodotto in vigore alla data di spedizione del prodotto da Illumina. La documentazione include questo documento. "**Hardware**" indica strumenti, accessori o periferiche Illumina. "**Illumina**" indica Illumina, Inc. o un'affiliata Illumina, come applicabile. "**Prodotto**" indica il prodotto che accompagna questo documento (ad esempio, hardware, materiali di consumo o software). "**Acquirente**" è la persona o l'entità che acquisisce legittimamente e legalmente questo prodotto da Illumina o da un rivenditore autorizzato Illumina. "**Software**" indica il software con marchio Illumina, ad esempio, software operativo per l'hardware o software di analisi dei dati. Il software viene concesso in licenza e non venduto e può essere soggetto a condizioni ulteriori indicate nel contratto di licenza per l'utente finale. "**Specifiche**" indica le specifiche scritte da Illumina per questo prodotto, in vigore alla data di spedizione del prodotto medesimo da parte di Illumina.

2 **Diritti per l'utilizzo a solo scopo di ricerca**. In conformità con i presenti termini e condizioni e se non altrimenti concordato per iscritto da un funzionario Illumina, all'acquirente viene concesso esclusivamente un diritto non esclusivo, non trasferibile, personale, che non può essere fatto oggetto di sublicenza, ai sensi della PI base Illumina, esistente alla data di spedizione di questo prodotto da parte di Illumina, a utilizzare unicamente questo prodotto presso l'impianto dell'acquirente a scopo di ricerca interna (il che comprende i servizi di ricerca forniti a terzi) e unicamente in conformità con la documentazione di questo prodotto, **ma escludendo espressamente qualsiasi uso che** (a) richiederebbe diritti o una licenza da parte di Illumina per PI per applicazioni specifiche, (b) costituisca riutilizzo di un materiale di consumo utilizzato in precedenza, (c) costituisca disassemblaggio, reverse engineering, reverse compiling o reverse assembling di questo prodotto, (d) costituisca separazione, estrazione o isolamento dei componenti di questo prodotto o altra analisi non autorizzata del medesimo, (e) determini l'accesso o individui le modalità di funzionamento di questo prodotto, (f) costituisca utilizzo di reagenti/materiali di consumo non forniti da Illumina con l'hardware del medesimo (non applicabile se le specifiche o la documentazione indicano altrimenti) o (g) costituisce cessione a terzi o sublicenza del software, o di qualsiasi software di terzi. Il software, che venga fornito separatamente, installato o incorporato in un prodotto, viene concesso in licenza all'acquirente e non venduto. A eccezione di quanto espressamente indicato nella presente sezione, nessun diritto o licenza sui diritti di proprietà intellettuale di Illumina viene concessa, espressamente, implicitamente o in base al principio di inopponibilità.

È esclusiva responsabilità dell'acquirente assicurarsi di disporre di tutti i diritti di proprietà intellettuale necessari per gli usi che intende fare di questo prodotto compresi, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, diritti da terzi o diritti sulla PI per applicazioni specifiche. Illumina non garantisce in alcun modo che gli usi specifici previsti dall'acquirente non violino i diritti di proprietà intellettuale di terzi o la PI per applicazioni specifiche.

3 **Disposizioni normative**. Questo prodotto non è stato autorizzato o approvato da parte della FDA statunitense o di qualsiasi altro ente normativo nazionale o estero per qualsiasi uso specifico, di ricerca, commerciale, diagnostico o diverso. Questo prodotto è etichettato "Solo per l'utilizzo a scopo di ricerca". L'acquirente deve assicurarsi di disporre delle eventuali autorizzazioni di legge necessarie per gli usi previsti di questo prodotto.

4 **Utilizzi non autorizzati**. L'acquirente accetta quanto segue: (a) di utilizzare ogni materiale di consumo solo una volta e (b) di utilizzare esclusivamente materiali di consumo/reagenti Illumina in combinazione con l'hardware Illumina. Le limitazioni di cui ai punti (a)-(b) non si applicano se la documentazione o le specifiche di questo prodotto indicano altrimenti. L'acquirente concorda di non intraprendere alcuna delle seguenti attività e di non autorizzare terzi a farlo: (i) disassemblare, eseguire il reverse engineering, il reverse compiling o il reverse assembling di questo prodotto, (ii) separare, estrarre o isolare componenti di questo prodotto o sottoporre questo prodotto o suoi componenti a qualsiasi analisi non espressamente autorizzata nella documentazione di questo prodotto, (iii) ottenere l'accesso o tentare di determinare le modalità di funzionamento di questo prodotto o (iv) trasferire a terzi, o concedere in sublicenza, qualsiasi software come sopra definito, o qualsiasi software di terze parti. L'acquirente accetta inoltre che il contenuto e le modalità di funzionamento di questo prodotto sono di proprietà di Illumina e che questo prodotto include o incorpora segreti commerciali di Illumina. Le condizioni e le limitazioni incluse nei presenti termini e condizioni sono condizioni di vendita negoziate e, conseguentemente, controllano la vendita e l'utilizzo di questo prodotti da parte dell'acquirente.

5 **Limitazione di responsabilità. NEI LIMITI CONSENTITI DALLA LEGGE, IN NESSUN CASO ILLUMINA O I SUOI FORNITORI POTRANNO ESSERE RITENUTI RESPONSABILI NEI CONFRONTI DELL'ACQUIRENTE O DI TERZI PER COSTI DI ACQUISIZIONE DI PRODOTTI O SERVIZI SOSTITUTIVI, LUCRO CESSANTE, PERDITA DI DATI O OPPORTUNITÀ COMMERCIALI, O PER DANNI INDIRETTI, SPECIALI, ACCIDENTALI, ESEMPLARI, CONSEGUENTI O PUNITIVI DI QUALSIASI TIPO DERIVANTI O COLLEGATI, A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO, CON LA VENDITA DI QUESTO PRODOTTO, IL SUO UTILIZZO, L'ADEMPIMENTO DI ILLUMINA AI SENSI DELLA PRESENTE O CON UNO O PIÙ DEI PRESENTI TERMINI E CONDIZIONI, QUALUNQUE NE SIA LA DERIVAZIONE O LA CAUSA E INDIPENDENTEMENTE DAL TITOLO DI RESPONSABILITÀ (CONTRATTUALE, PER ILLECITO (INCLUSA LA NEGLIGENZA), RESPONSABILITÀ OGGETTIVA O ALTRO).**

6 **LA RESPONSABILITÀ TOTALE E COMPLESSIVA DI ILLUMINA NEI CONFRONTI DELL'ACQUIRENTE O DI TERZI, DERIVANTE O IN CONNESSIONE CON I PRESENTI TERMINI E CONDIZIONI INCLUSI, A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO, QUESTO PRODOTTO (E IL SUO UTILIZZO) E L'ADEMPIMENTO DI ILLUMINA AI SENSI DELLA PRESENTE, A TITOLO DI RESPONSABILITÀ CONTRATTUALE, ILLECITO (INCLUSA LA NEGLIGENZA), RESPONSABILITÀ OGGETTIVA O ALTRO, IN NESSUN CASO POTRÀ SUPERARE L'IMPORTO CORRISPOSTO A ILLUMINA PER QUESTO PRODOTTO.**

7 **Limitazioni sulle garanzie fornite da Illumina. NEI LIMITI CONSENTITI DALLA LEGGE E IN CONFORMITÀ CON LA GARANZIA ESPLICITA DEL PRODOTTO PREVISTA DAI PRESENTI TERMINI E CONDIZIONI, ILLUMINA NON FORNISCE (ED ESCLUDE ESPRESSAMENTE) QUALSIASI GARANZIA, ESPLICITA, IMPLICITA O DI LEGGE, IN RELAZIONE A QUESTO PRODOTTO COMPRESE, A TITOLO ESEMPLIFICATIVO MA NON ESAUSTIVO, GARANZIE IMPLICITE DI COMMERCIABILITÀ, IDONEITÀ PER UN SCOPO SPECIFICO, NON VIOLAZIONE DI DIRITTI ALTRUI, O DERIVANTI DA ADEMPIMENTO, RAPPORTI COMMERCIALI, UTILIZZO O ATTIVITÀ COMMERCIALE. SENZA LIMITAZIONE DELLA GENERALITÀ DI QUANTO SOPRA, ILLUMINA ESCLUDE QUALSIASI DICHIARAZIONE O GARANZIA DI**

QUALSIVOGLIA TIPO IN RELAZIONE ALL'UTILITÀ DI QUESTO PRODOTTO PER L'IMPIEGO DA PARTE DELL'ACQUIRENTE.

8 **Garanzia sul prodotto**. Tutte le garanzie sono personali per l'acquirente e non possono essere trasferite o cedute a terzi, inclusi affiliati dell'acquirente medesimo. Tutte le garanzie sono relative a impianti specifici e non vengono trasferite in caso di spostamento del prodotto ad altro impianto dell'acquirente, a meno che non sia Illumina a predisporre tale spostamento.

a **Garanzia sui materiali di consumo**. Illumina garantisce che i materiali di consumo, diversi da quelli personalizzati, saranno conformi alle relative specifiche, fino a (i) 3 mesi dalla data di spedizione da parte di Illumina o (ii) fino alla data di scadenza o al termine del periodo di validità indicato sul materiale di consumo da Illumina, se successivo; ma in ogni caso non oltre 12 mesi dalla data di spedizione. Per quanto riguarda i materiali di consumo personalizzati (vale a dire, confezionati in base a specifiche o indicazioni dell'acquirente o forniti a Illumina da o per conto dell'acquirente), Illumina garantisce esclusivamente che i materiali di consumo personalizzati saranno prodotti e testati in conformità con i processi standard di controllo qualità e produzione di Illumina. Illumina non garantisce che i materiali consumabili personalizzati funzioneranno come previsto dall'acquirente o per gli usi da lui previsti.

b **Garanzia sull'hardware**. Illumina garantisce che l'hardware, diverso dai componenti aggiornati, sarà conforme alle relative specifiche, per un periodo di 12 mesi dalla data di spedizione da parte di Illumina, a meno che non includa l'installazione a opera di Illumina: in tal caso, il periodo di garanzia decorrerà dalla data di installazione o dal 30° giorno successivo alla data di consegna, se precedente (di seguito la "Garanzia hardware base"). Per "componenti aggiornati" si intendono componenti, modifiche o miglioramenti apportati da Illumina all'hardware precedentemente acquisito dall'acquirente. Illumina garantisce che i componenti aggiornati saranno conformi alle relative specifiche per un periodo di 90 giorni dalla data di installazione I componenti aggiornati non estendono la garanzia dell'hardware, a meno che l'aggiornamento non sia stato eseguito da illumina presso i propri stabilimenti, nel qual caso all'hardware aggiornato spedito all'acquirente si applicherà la garanzia hardware di base.

c **Esclusioni dalla garanzia**. Le garanzie di cui sopra non si applicano qualora la mancata conformità sia dovuta a: (i) abuso, uso improprio, negligenza, colpa, incidente, conservazione inadeguata o uso contrario alla documentazione o alle specifiche, (ii) movimentazione, installazione, manutenzione o riparazione impropria (a meno che eseguita da personale Illumina), (iii) modifiche non autorizzate, (iv) eventi di forza maggiore o (v) utilizzo con un articolo di terzi non fornito da Illumina (a meno che la documentazione o le specifiche del prodotto indichino espressamente tale articolo come adatto per l'utilizzo con il prodotto).

d **Procedure per l'applicazione della garanzia**. A scopo di idoneità in relazione alla riparazione o alla sostituzione in garanzia, l'acquirente deve (i) rivolgersi prontamente al Servizio assistenza Illumina per segnalare la non conformità, (ii) fornire la propria collaborazione a Illumina allo scopo di confermare o diagnosticare la non conformità e (iii) restituire questo prodotto a Illumina, anticipando le spese di trasporto, in base alle istruzioni di Illumina o, se concordato tra le parti, consentire al riparatore autorizzato di Illumina di accedere al prodotto, al fine di confermare la non conformità e procedere alla riparazione.

e **Esclusività della tutela in garanzia**. Illumina provvederà, a sua discrezione, a riparare o a sostituire il prodotto non conforme del quale abbia confermato la copertura in garanzia. Ai materiali di consumo riparati o sostituiti si applica una garanzia di 30 giorni. L'hardware può essere riparato o sostituito con hardware o componenti funzionalmente equivalenti, ricondizionati o nuovi (anche se solo un solo componente dell'hardware sia non conforme). Qualora l'hardware venga sostituito interamente, il periodo di garanzia per la sostituzione è il periodo più breve tra i 90 giorni successivi alla data di spedizione e la durata restante della garanzia hardware originale. Qualora venga sostituito o riparato unicamente un componente, il periodo di garanzia per il suddetto componente è il periodo che termini più tardi tra i 90 giorni successivi alla data di spedizione e la durata restante della garanzia hardware originale. Quanto sopra esaurisce i mezzi di tutela a disposizione dell'acquirente e gli obblighi di Illumina ai sensi della garanzia qui prevista.

f **Articoli di terzi e garanzia**. Illumina non ha alcun obbligo di garanzia in relazione a qualsiasi articolo proveniente da terzi e fornito all'acquirente ai sensi della presente. Sono articoli di terzi quelli riportanti marchio o etichetta con il

nome di un terzo. L'eventuale garanzia per gli articoli di terzi è fornita dal produttore originale. Previa richiesta scritta, Illumina tenterà di passare eventuali garanzie di tale tipo all'acquirente.

9 **Indennizzo**.

a **Indennizzo per violazione di diritti di terzi da parte di Illumina**. In conformità ai presenti termini e condizioni comprese, a titolo esemplificato ma non esaustivo, le esclusioni agli obblighi di indennizzo di Illumina (sezione 9(b) di seguito) e le condizioni degli obblighi di indennizzo (sezione 9(d) di seguito), Illumina sarà tenuto (i) a difendere, manlevare e tenere l'acquirente indenne da ogni pretesa o azione di terzi basata sulla presunta violazione di diritti di proprietà intellettuale validi e applicabili di terzi da parte di questo prodotto, quando utilizzato a scopi di ricerca, in conformità con i presenti termini e condizioni, e in conformità con la documentazione e le specifiche relative e (ii) a sostenere i costi di qualsivoglia transazione, sentenza definitiva e spesa (comprese le ragionevoli spese legali) che l'acquirente debba sostenere in relazione a tale pretesa violazione. Qualora questo prodotto o parte di esso divenga o possa diventare secondo l'opinione di Illumina, oggetto di azione per violazione di diritti di terzi, sarà facoltà di Illumina, a sua discrezione: (A) di procurare all'acquirente il diritto di continuare a utilizzare questo prodotto, (B) di modificare o sostituire questo prodotto con un sostituto sostanzialmente equivalente che non configuri violazione o (C) di richiedere la restituzione di questo prodotto e porre fine ai diritti, alla licenza e a ogni altra autorizzazione fornita all'acquirente in relazione a esso, nonché a rimborsare all'acquirente il valore (come indicato nei documenti ufficiali dell'acquirente) del prodotto restituito, tenendo conto dell'ammortamento maturato al momento della restituzione; considerando che nessun rimborso verrà effettuato per i materiali di consumo usati o scaduti. La presente sezione esaurisce la responsabilità di Illumina per qualsiasi violazione di diritti di proprietà intellettuale di terzi.

b **Esclusioni agli obblighi di indennizzo di Illumina**. Illumina ha l'obbligo di difendere, indennizzare e tenere indenne l'acquirente da qualsiasi pretesa violazione di diritti di terzi da parte di Illumina, nella misura in cui essa derivi da: (i) l'utilizzo di questo prodotto in qualsiasi modo o per qualsiasi scopo non compreso nell'ambito dell'utilizzo per scopi di ricerca, (ii) l'utilizzo di questo prodotto in modo non conforme alle sue caratteristiche tecniche, alla documentazione, ai diritti espressamente concessi all'acquirente nell'ambito della presente o in violazione, da parte dell'acquirente, dei presenti termini e condizioni, (iii) l'utilizzo di questo prodotto in combinazione con altri prodotti, materiali o servizi non forniti da Illumina, (iv) l'utilizzo di questo prodotto per eseguire saggi o altri processi non forniti da Illumina o (v) la conformità di Illumina con specifiche o istruzioni per questo prodotto fornite da o per conto dell'acquirente (ciascuno dei punti da (i) a (v) viene di seguito definito come una "Pretesa oggetto di esclusione").

c **Indennizzo da parte dell'acquirente**. L'acquirente dovrà difendere, manlevare e tenere indenne Illumina, i suoi affiliati, i loro collaboratori non affiliati e partner di sviluppo che abbiano contribuito allo sviluppo di questo prodotto, nonché i rispettivi funzionari, dirigenti, rappresentanti e dipendenti, da qualsiasi pretesa, responsabilità, danno, multa, penale, azione legale e perdita di ogni e qualsivoglia tipo comprese, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, azioni per danni a persone o decesso, e violazioni di diritti di proprietà intellettuale di terzi, derivanti, relativi o che siano originati da (i) violazione da parte dell'acquirente di uno dei presenti termini e condizioni, (ii) utilizzo di questo prodotto da parte dell'acquirente al di fuori dell'ambito di utilizzo per scopi di ricerca, (iii) qualsiasi utilizzo di questo prodotto non conforme alle specifiche o alla documentazione relativa o (iv) qualsiasi pretesa oggetto di esclusione.

d **Condizioni degli obblighi di indennizzo**. Gli obblighi di indennizzo delle parti sono condizionali al fatto che la parte che richiede l'indennizzo (i) informi tempestivamente la controparte, in forma scritta, della pretesa o dell'azione relativa, (ii) conferisca alla controparte controllo e autorità esclusivi in relazione alla difesa e alla transazione di tale pretesa o azione, (iii) non ammetta la violazione di qualsivoglia diritto di proprietà intellettuale altrui senza il preventivo consenso scritto della controparte, (iv) non concluda alcuna transazione o compromesso relativo a qualsivoglia pretesa o azione senza il preventivo consenso scritto della controparte e infine (v) fornisca ragionevole assistenza alla controparte nella difesa della pretesa o azione; a condizione che la parte indennizzata venga rimborsata dalla controparte per le ragionevoli spese effettivamente sostenute per fornire tale assistenza.

e **Articoli di terzi e indennizzo**. Illumina non ha alcun obbligo di indennizzo in relazione a qualsiasi articolo proveniente da terzi e fornito all'acquirente. Sono articoli di terzi quelli riportanti marchio o etichetta con il nome di un terzo. Gli eventuali diritti di indennizzo dell'acquirente in relazione ad articoli di terzi saranno quelli previsti ai sensi degli obblighi di indennizzo del produttore o del licenziante originale. Previa richiesta scritta, Illumina tenterà di passare eventuali garanzie di tale tipo all'acquirente.

Cronologia revisioni

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15027617_ITA	O	Settembre 2014	Aggiornate le informazioni seguenti: • Nuovo in MCS v2.5, aggiornata l'opzione di lavaggio post-corsa per includere il lavaggio della linea del templato • Aggiornate le indicazioni per un lavaggio post-corsa con ipoclorito di sodio al lavaggio della linea del templato • Aggiunto il volume di lavaggio previsto per un lavaggio post-corsa Aggiunte le informazioni sul flusso di lavoro VeriSeq relative a risorse aggiuntive, opzioni della corsa, opzioni di analisi secondaria, lavaggi dello strumento e colore del cappuccio della cella a flusso.
15027617	N	Giugno 2014	Disponibile solo in inglese. Aggiunte le informazioni applicabili al flusso di lavoro VeriSeq. Aggiornate le informazioni relative alle metriche della corsa per la generazione e la densità cluster. Rimosse le informazioni sul software antivirus. Vedere *Guida alla preparazione della sede di installazione del sistema MiSeq*.
15027617_ITA	M	Gennaio 2014	Aggiornato per la modifica introdotta in MCS v2.4: Aggiunta la funzione Bundle Logs (Raggruppa log) per inviare i file per la risoluzione dei problemi.

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15027617	L	Ottobre 2013	Disponibile solo in inglese. Aggiunto il riavvio del software del sistema come passaggio pre-corsa. Aggiunte le provette per microcentrifuga all'elenco dei materiali di consumo forniti dall'utente. Eliminato *Software MiSeq* come capitolo separato e distribuiti i contenuti del capitolo per tutta la guida. Rimosse le informazioni relative alle cartelle per le ricette personalizzate. Rimosse le informazioni relative agli intervalli per la densità cluster per i kit di reagenti MiSeq. Rimossi i dettagli relativi ai kit di reagenti MiSeq e aggiunta una panoramica sulle caratteristiche dei kit di reagenti. Per informazioni dettagliate, vedere la documentazione per la preparazione dei reagenti per il kit in uso. Aggiunto contenuto all'avviso sui marchi di fabbrica.
15027617_ITA	K	Agosto 2013	Corretti errori di formattazione.
15027617	J	Agosto 2013	Disponibile solo in inglese. Aggiunte le descrizioni della corsa per MCS v2.3 e per il kit di reagenti MiSeq v3. Aggiornate le informazioni seguenti: • Compatibilità versione e kit di reagenti per includere il kit di reagenti MiSeq v3. • Descrizione della cartella Custom Recipes (Ricette personalizzate) per includere una sottocartella v.3 • Cambiato l'intervallo per la densità cluster per v2; aggiunto l'intervallo per v3 • Percorso di output per i file di immagine Corretti i codici a barre delle celle a flusso per le celle a flusso nano (D) e le celle a flusso micro (G). Rimosse le informazioni relative al kit di reagenti MiSeq, inclusi i tipi di cella a flusso e i contenuti. Per ulteriori informazioni, vedere *Guida di preparazione dei reagenti MiSeq (n. codice 15044983)*.

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15027617_ITA	H	Marzo 2013	Aggiunta la sezione intitolata *Concetti di MiSeq* che introduce il flusso di lavoro di analisi, il file manifest e il foglio campioni. Rimosse le informazioni relative alla generazione del file FASTQ, ai formati file manifest, ai dettagli del flusso di lavoro di analisi e ai dettagli del foglio campioni. Per informazioni relative a questi argomenti, vedere *Guida per l'utente MiSeq Reporter*, n. codice 15028784 oppure *Foglio campioni MiSeq - Guida di consultazione rapida*, n. codice 15028392. Rimosse le istruzioni per la preparazione dei primer custom. Per maggiori informazioni, vedere *Utilizzo di primer custom su MiSeq*, n. codice 15041638.
15027617	G	Gennaio 2013	Disponibile solo in inglese. Rimosse le istruzioni per denaturare e diluire le librerie di DNA e per preparare un campione di controllo PhiX Illumina. Vedere *Preparazione delle librerie di DNA per il sequenziamento su MiSeq*, n. codice 15039740. Aggiornate le istruzioni di lavaggio dello strumento per aggiungere 25 ml di Tween 20 10% a 475 ml di acqua da laboratorio, invece di 500 ml di acqua da laboratorio.
15027617_ITA	F	Novembre 2012	Aggiunte le nuove informazioni seguenti: • Aggiunte le descrizioni per il nuovo kit di reagenti MiSeq: Kit di reagenti MiSeq Nano e Kit di reagenti MiSeq Micro • Aggiunta la panoramica relativa ai tipi di cella a flusso • Aggiunta la descrizione del flusso di lavoro di analisi Enrichment (Arricchimento) Aggiornate le informazioni seguenti: • Novità di MCS v2.1, aggiornata la schermata Perform Wash (Esecuzione lavaggio) per aggiungere un'opzione di lavaggio post-corsa e un comando per sollevare i pescanti • Aggiornata la tabella relativa alla compatibilità delle versioni per includere le dipendenze dei kit nano e micro • Aggiornate le informazioni relative alla compatibilità delle versioni per includere nuovi kit di reagenti

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15027617	E	Ottobre 2012	Disponibile solo in inglese. Aggiornate le informazioni seguenti: • Corrette le istruzioni di preparazione del campione di controllo PhiX e la densità cluster prevista del controllo PhiX preparato a 1000-1200 K/mm² • Segnalato che le procedure per denaturare e diluire le librerie, indicate in *Preparazione delle librerie*, non si applica alle librerie Nextera XT e alle librerie TruSeq Amplicon • Cambiato il nome dell'aggiornamento da MiSeq Expansion Pack a MiSeq Hardware Upgrade • Aggiunta la *Guida per l'utente di MiSeq Reporter* all'elenco delle Risorse addizionali.

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15027617_ITA	D	Luglio 2012	Aggiornate le descrizioni software secondo MCS v2.0. Aggiunte le nuove informazioni seguenti: • Aggiunta una sezione intitolata *Novità in MCS* per descrivere le nuove funzioni software, le modifiche all'interfaccia e le modifiche al flusso di lavoro • Aggiunto n. di catalogo e descrizione del kit di reagenti MiSeq v2, 500 cicli • Aggiunta sezione su compatibilità versione e requisiti • Aggiunta descrizione di MiSeq Expansion Pack, che è necessario per l'imaging a 14 tile con cella a flusso a superficie doppia (dual-surface) • Aggiunta descrizione della numerazione tile con cella a flusso a superficie doppia (dual-surface) • Aggiunto il flusso di lavoro di analisi PCR Amplicon per librerie Nextera XT • Aggiunto l'uso di Tween 20 10% nelle procedure di lavaggio e i volumi attesi di lavaggio • Aggiunta la versione cartuccia di reagenti alla procedura guasto lettura RFID Aggiornate le informazioni seguenti: • Modificati gli acronimi per i reagenti IMF, CMF e AMX ai nomi v2 dei reagenti IMS, CMS e AMS, rispettivamente • Modificata la concentrazione PhiX da 8 pM a 12,5 pM • Modificata a 1 mM la concentrazione massima consigliata per NaOH nella soluzione finale • Segnalato che per far uscire lo strumento dalla modalità standby e iniziare le fasi di impostazione per una successiva corsa è necessario un lavaggio di manutenzione • Rimossa la sezione Parametri del foglio campioni e rimossa la fase impostazione foglio campioni nel flusso di lavoro; Illumina consiglia di creare il foglio campioni prima della preparazione dei campioni (vedere la *Guida di consultazione rapida foglio campioni di MiSeq*, n. codice 15028392 e la *Guida per l'utente di Experiment Manager Illumina*, n. codice 15031335)

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15027617	C	Aprile 2012	Disponibile solo in inglese. Aggiornate le descrizioni software secondo MCS v1.2 Aggiunte le seguenti nuove procedure e sezioni: Panoramica su BaseSpace, Utilizzo dei primer custom, Generazione dei file FASTQ, Risoluzione dei problemi su errore portata, Esecuzione di un test volume, Esecuzione di un lavaggio di manutenzione e Porre lo strumento nello stato inattivo (idling), che include un lavaggio di standby. Aggiornate le informazioni seguenti: • Aggiornato il nome del flusso di lavoro Amplicon a Custom Amplicon; aggiornato il nome del flusso di lavoro DenovoAssembly a Assembly; aggiunto il flusso di lavoro GenerateFASTQ • Aggiunte descrizioni di cartelle e file della corsa; aggiornato l'assegnamento del nome alla cartella della corsa; aggiunto dimensione file di output • Elencata la cartella genoma come obbligatoria per il sequenziamento ampliconi in Parametri foglio campioni • Aggiunte istruzioni per la diluizione di NaOH per la denaturazione delle librerie • Aggiornata la risoluzione dell'errore lettura RFID includendo istruzioni MiSeq Self-Service • Elencati file e cartelle usati per la risoluzione dei problemi sulle prestazioni corsa

N. codice	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15027617_ITA	B	Dicembre 2011	Aggiornate le descrizioni software secondo MCS v1.1 Aggiunte informazioni sulla protezione antivirus Aggiornate le informazioni seguenti: • Istruzioni per risolvere l'errore di lettura dell'etichetta RFID • Preparazione librerie: cambiato a 0,2 N NaOH • Convenzione per assegnamento nomi a cartella corsa • Spazio disco necessario e capacità di memorizzazione • Fasi di impostazione corsa: aggiunte maggiori informazioni in Impostazione del foglio campioni • Fasi di impostazione corsa: aggiunta nota per lo smaltimento del PR2 residuo • Durata dell'analisi: aggiunto quando l'analisi dura più di due ore • Requisiti per l'input per l'analisi: elencati i file manifest come richiesto per le librerie TruSeq Custom Amplicon • Corretto dimensioni provetta HT1 in Contenuti kit di reagenti MiSeq • Modificati i riferimenti iCom, sostituiti con MyIllumina
15027617	A	Settembre 2011	Disponibile solo in inglese. Versione iniziale

Sommario

Cronologia revisioni ix
Sommario xvii

Capitolo 1 Informazioni preliminari 1

Introduzione 2
Componenti 5
Panoramica sul kit di reagenti MiSeq 10
Materiali di consumo forniti dall'utente 11
Avvio del sistema MiSeq 13
Concetti di MiSeq 14
Software MiSeq 15
Opzioni per l'analisi secondaria 29
Cartelle delle corse 32
Spazio su disco necessario 35

Capitolo 2 Esecuzione di una corsa 37

Introduzione 38
Flusso di lavoro MiSeq 39
Caricamento delle librerie campioni 41
Impostazione di una corsa utilizzando MCS 43
Pulizia della cella a flusso 44
Caricamento della cella a flusso 47
Caricamento dei reagenti 50
Avvio della corsa 54
Monitoraggio della corsa 56

Capitolo 3 Procedure di manutenzione 61

Introduzione 62
Lavaggi dello strumento 65
Esecuzione di un lavaggio post-corsa 67
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione 73
Esecuzione di un lavaggio per lo standby 77
Aggiornamenti software 80
Spegnimento dello strumento 81

Capitolo 4 Risoluzione dei problemi 83

Introduzione 84
Bundle Logs (Raggruppa log) per la risoluzione dei problemi 85
Impostazioni del software 87
Sospensione o arresto di una corsa 92
Risoluzione degli errori d'impostazione corsa 95
Risoluzione degli errori di lettura dell'etichetta RFID 97
Risoluzione errore portata 99
Esecuzione di un test volume 100
Misurazione dei volumi di lavaggio attesi 104

Indice 105

Assistenza tecnica 109

Capitolo 1

Informazioni preliminari

Introduzione 2
Componenti 5
Panoramica sul kit di reagenti MiSeq 10
Materiali di consumo forniti dall'utente 11
Avvio del sistema MiSeq 13
Concetti di MiSeq 14
Software MiSeq 15
Opzioni per l'analisi secondaria 29
Cartelle delle corse 32
Spazio su disco necessario 35

Introduzione

Il sistema Illumina MiSeq® combina la sperimentata tecnologia Illumina di sequenziamento mediante sintesi (SBS) con un flusso di lavoro rivoluzionario che consente ai ricercatori di ottenere dati analizzati dai campioni di DNA in un tempo record di otto ore. Il sistema MiSeq integra le funzioni di generazione di cluster, sequenziamento e analisi dei dati su un unico strumento.

Caratteristiche

- **Automazione totale**: dopo aver ultimato l'impostazione della corsa, che comprende il caricamento della cartuccia di reagenti pre-riempita, del flacone del tampone e della cella a flusso, non sono necessari altri interventi manuali.
- **Cartuccia di reagenti pre-riempita**: una cartuccia monouso di speciale progettazione già riempita con i reagenti necessari per la generazione di cluster e il sequenziamento, compresi i reagenti per il sequenziamento paired-end e l'indicizzazione. L'identificazione a radiofrequenza integrata (RFID) consente un monitoraggio accurato dei materiali di consumo.
- **Comandi dell'interfaccia**: l'interfaccia del Software di controllo MiSeq (MCS) fornisce comandi per configurare lo strumento, impostare e monitorare le corse ed eseguire procedure di manutenzione.
- **Praticità del caricamento della cella a flusso**: un meccanismo a morsetti posiziona automaticamente la cella a flusso quando viene caricata sullo strumento. L'identificazione a radiofrequenza integrata (RFID) consente un monitoraggio accurato dei materiali di consumo.
- **Innovativa architettura della fluidica**: il sistema di fluidica di MiSeq consente di raggiungere livelli di efficienza senza precedenti in termini di durata del ciclo chimico durante il sequenziamento.
- **Analisi in tempo reale (RTA)**: il software integrato per l'analisi primaria che esegue analisi dei dati in tempo reale integrata sullo strumento durante la corsa di sequenziamento, comprese l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi, accelerando di conseguenza i tempi di analisi a valle.
- **MiSeq Reporter**: software integrato per l'analisi secondaria che elabora i dati ottenuti dall'analisi primaria per eseguire l'allineamento e fornire informazioni su ciascun campione analizzato.

Risorse addizionali

È possibile scaricare la documentazione seguente dal sito Web Illumina.

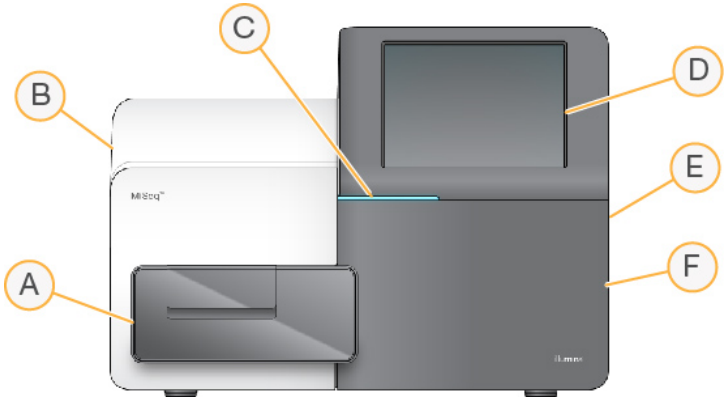
Risorsa	Descrizione
Guida alla preparazione della sede di installazione del sistema MiSeq	Fornisce le specifiche relative ai locali del laboratorio, i requisiti elettrici e ambientali.
Guida sulla sicurezza e conformità del sistema MiSeq	Fornisce informazioni sulla etichettatura dello strumento, le certificazioni di conformità e gli aspetti relativi alla sicurezza.
Schede di riferimento rapido per il flusso di lavoro MiSeq	Fornisce una rappresentazione grafica a due pagine del flusso di lavoro per l'utente esperto. Le schede di riferimento rapido riassumono la preparazione dei campioni, l'impostazione della corsa e il monitoraggio della corsa e forniscono una panoramica dell'analisi eseguita da MiSeq Reporter.
Guida per l'utente di Illumina Experiment Manager	Fornisce istruzioni per la creazione di piastre campioni e dei fogli campioni per differenti flussi di lavoro e tipi di librerie, Illumina consiglia di creare il foglio campioni durante la fase di preparazione dei campioni.
Guida di riferimento di BlueFuse Workflow Manager	Fornisce istruzioni per la creazione di piastre campioni e di fogli campioni per i clienti che eseguono il flusso di lavoro VeriSeq. Illumina consiglia di creare il foglio campioni durante la fase di preparazione dei campioni.
Guida di consultazione rapida del foglio campioni MiSeq	Fornisce informazioni su come aggiungere impostazioni del foglio campioni al foglio campioni.
Guida per la preparazione dei reagenti MiSeq	Fornisce una descrizione dei contenuti dei kit e istruzioni per preparare la cartuccia di reagenti prima di avviare la corsa di sequenziamento.
Preparazione delle librerie DNA per il sequenziamento su MiSeq	Fornisce istruzioni per denaturare e diluire le librerie dei campioni preparate prima del sequenziamento su MiSeq e per preparare un campione di controllo PhiX. Questa fase si applica alla maggior parte dei tipi di librerie.

Risorsa	Descrizione
Utilizzo dei primer custom su MiSeq	Fornisce istruzioni per preparare e caricare i primer custom e per modificare il foglio campioni per i primer custom.
Guida per l'utente del sistema MiSeq Reporter	Fornisce una panoramica completa su procedure di analisi, flussi di lavoro di analisi e file di output generati da MiSeq Reporter, come anche requisiti di sistema, istruzioni per l'installazione su computer non integrati e informazioni relative alla risoluzione dei problemi.
Guida di riferimento BlueFuse Multi	Per i clienti che eseguono il flusso di lavoro VeriSeq, fornisce una panoramica completa delle procedure di analisi, dei flussi di lavoro di analisi e dei file generati da BlueFuse Multi, come anche i requisiti di calcolo e le informazioni sulla risoluzione dei problemi.
Guida online di MiSeq Reporter	Fornisce istruzioni sull'uso del software MiSeq Reporter.
Guida online di BaseSpace	Fornisce informazioni sull'utilizzo di BaseSpace e descrizioni dei grafici generati da ciascun flusso di lavoro di analisi.

Consultare la pagina si assistenza del sistema MiSeq sul sito Web Illumina per accedere alla documentazione, ai download del software, ai training online e alle domande frequenti (FAQ).

Componenti

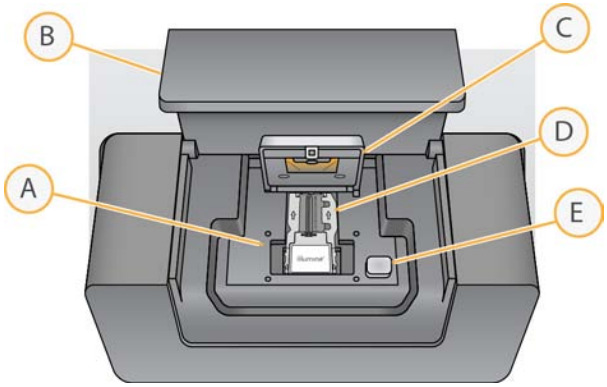
MiSeq è costituito dai seguenti componenti visibili dall'esterno:



- A **Scomparto della cella a flusso**: contiene il piano portacelle che ospita la cella a flusso durante l'esecuzione della corsa. I motori del piano portacelle fanno fuoriuscire il piano dal modulo ottica incorporato per permettere il caricamento della cella a flusso e il successivo riposizionamento in sede all'avvio della corsa.
- B **Modulo ottica incorporato**: contiene i componenti ottici che consentono l'imaging della cella a flusso.
- C **Barra di stato**: utilizza tre colori per indicare lo stato dello strumento. Il blu indica che lo strumento è in funzione, l'arancione indica la necessità di un intervento da parte dell'utente e il verde indica che lo strumento è pronto a iniziare la corsa successiva.
- D **Monitor touch screen**: permette la configurazione integrata sullo strumento e l'impostazione della corsa utilizzando l'interfaccia software.
- E **Porte USB esterne**: facilitano il trasferimento dei file e dei dati al computer dello strumento attraverso il monitor touch screen.
- F **Scomparto reagenti**: contiene i reagenti mantenendoli alle temperature adatte, le soluzioni di lavaggio e il flacone degli scarti. Il dispositivo magnetico a scatto chiude lo sportello dello scomparto reagenti.

L'interfaccia MiSeq guida l'utente lungo la procedura di impostazione della corsa, eseguita mediante il touch screen. Per caricare i componenti della corsa, è necessario accedere allo scomparto reagenti e allo scomparto della cella a flusso.

Scomparto della cella a flusso

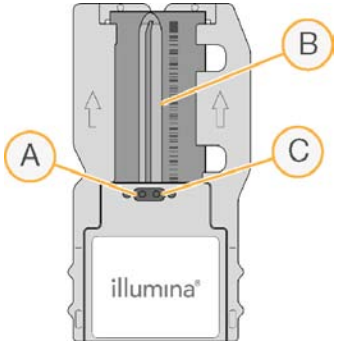


A Piano portacelle
B Sportello dello scomparto della cella a flusso
C Coperchio a scatto
D Cella a flusso
E Pulsante di sblocco del coperchio a scatto

Lo scomparto della cella a flusso contiene il piano portacelle, la stazione termica e le connessioni della fluidica alla cella a flusso. Il piano portacelle ospita la cella a flusso e il coperchio a scatto fissa e tiene in posizione la cella a flusso. Quando il coperchio è chiuso, due perni accanto alla cerniera posizionano automaticamente la cella a flusso.

La stazione termica, situata sotto il piano portacelle, controlla le variazioni di temperatura della cella a flusso, necessarie per la generazione di cluster e il sequenziamento.

Cella a flusso



A Porta di uscita
B Area di imaging
C Porta di ingresso

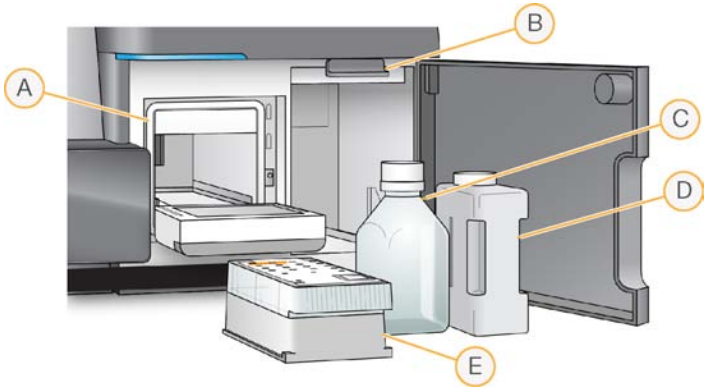
La cella a flusso MiSeq è un substrato su vetro monouso su cui vengono generati i cluster e viene eseguita la reazione di sequenziamento.

I reagenti penetrano nella cella a flusso tramite la porta di ingresso, attraversano l'area di imaging a singola corsia e defluiscono dalla porta di uscita. Gli scarti provenienti dalla cella a flusso vengono raccolti nel flacone degli scarti.

I campioni vengono caricati sulla cartuccia di reagenti prima dell'avvio della corsa per poi essere trasferiti automaticamente nella cella a flusso dopo l'avvio della corsa.

Durante la corsa di sequenziamento, la singola corsia è sottoposta a imaging secondo piccole aree di imaging denominate tile. Tutte le celle a flusso MiSeq presentano una singola corsia, ma il numero di tile varia in base al tipo di cella a flusso in uso.

Scomparto reagenti



A Vano refrigerato per i reagenti
B Maniglia del pettine di aspirazione (sollevata nella figura)
C Flacone di PR2
D Flacone degli scarti
E Cartuccia di reagenti

Lo scomparto reagenti comprende un vano refrigerato per i reagenti e un vano per il flacone del tampone di lavaggio (PR2) e il flacone degli scarti.

Durante la corsa, il vano refrigerato può contenere una cartuccia di reagenti monouso. Durante il lavaggio dello strumento, il vano refrigerato può contenere il vassoio di lavaggio. Il software abbassa automaticamente i pescanti in ciascun serbatoio della cartuccia di reagenti al momento opportuno durante la corsa, in base alla procedura in esecuzione.

A destra del vano refrigerato sono presenti due alloggiamenti appositamente conformati per accogliere rispettivamente il flacone di PR2 e il flacone degli scarti. La maniglia del pettine di aspirazione blocca in posizione i flaconi e abbassa in ciascun flacone il pescante appropriato. I reagenti vengono aspirati dai pescanti, scorrono nei tubi della fluidica e infine giungono alla cella a flusso. I reagenti di scarto vengono convogliati nel flacone degli scarti durante l'intero processo.

Cartuccia di reagenti

La cartuccia di reagenti MiSeq è un materiale di consumo monouso costituito da piccoli serbatoi sigillati da capsule di alluminio pre-riempiti con reagenti per la generazione di cluster e per il sequenziamento di una cella a flusso.

Ciascun serbatoio della cartuccia è numerato. Le librerie dei campioni vengono caricate sulla cartuccia nella posizione 17, etichettata **Load Samples** (Caricamento campioni).

Panoramica sul kit di reagenti MiSeq

Per eseguire una corsa sul MiSeq, è necessario utilizzare un kit di reagenti MiSeq monouso, disponibile in diversi tipi e dimensioni. Ciascun tipo di kit di reagenti MiSeq include un tipo di cella a flusso specifica per il kit e tutti i reagenti richiesti per eseguire una corsa.

La cella a flusso, il flacone di PR2 e la cartuccia di reagenti forniti nel kit utilizzano l'identificazione a radiofrequenza (RFID) per la compatibilità e il monitoraggio accurato dei materiali di consumo.

Utilizzare sempre la cartuccia di reagenti associata al tipo di cella a flusso. Se la cartuccia di reagenti non è compatibile, viene visualizzato un messaggio durante l'impostazione della corsa che invita a caricare una cartuccia di reagenti compatibile.

Per una descrizione dei kit di reagenti disponibili, visitare il sito Web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/miseq_reagent_kit.ilmn.

Per informazioni sui contenuti e sui requisiti del kit, fare riferimento alla documentazione sulla preparazione dei reagenti per il kit in uso.

Materiali di consumo forniti dall'utente

Prima di avviare una corsa di sequenziamento, accertarsi di avere a disposizione i seguenti materiali di consumo forniti dall'utente.

Materiale di consumo	Fornitore	Scopo
Stock 1,0 N NaOH, per biologia molecolare	Fornitore generico	Denaturazione delle librerie di campioni e del DNA di controllo PhiX
Salviettine imbevute di alcol isopropilico al 70% oppure di etanolo al 70%	VWR, n. di catalogo 95041-714* Fornitore generico	Pulizia del vano portacella
Guanti monouso, privi di polvere lubrificante	Fornitore generico	Uso generico
Panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle	VWR, n. di catalogo 21905-026*	Pulizia del piano portacelle e delle capsule in alluminio che coprono il serbatoio di caricamento dei campioni
Carta pulente per lenti, 10x15 cm ca.	VWR, n. di catalogo 52846-001*	Pulizia della cella a flusso
Provette per microcentrifuga	Fornitore generico	Denaturazione e diluizione delle librerie di campioni e di DNA di controllo PhiX
Ipoclorito di sodio	Fornitore generico	Lavaggio della linea del templato, da usare con il flusso di lavoro VeriSeq (opzionale per gli altri flussi di lavoro)
Tween 20	Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949	Lavaggio dello strumento
Pinzette di plastica con punta quadrata (opzionale)	McMaster-Carr, n. di catalogo 7003A22*	Estrazione della cella a flusso dal relativo contenitore
Acqua da laboratorio	Fornitore generico	Lavaggio dello strumento

* o equivalente

Linee guide per l'acqua da laboratorio

Per eseguire le procedure dello strumento usare sempre acqua da laboratorio. Non usare mai acqua di rubinetto o acqua deionizzata.

Quanto segue sono esempi accettabili di acqua da laboratorio:

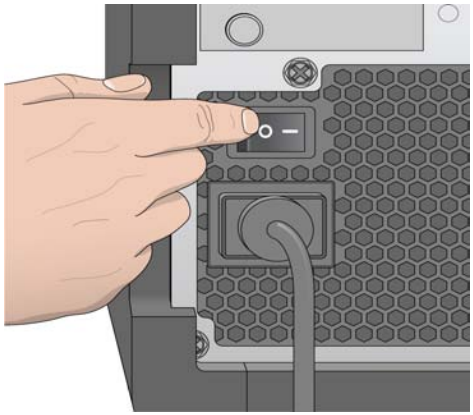
- PW1 Illumina
- Acqua con resistività pari a 18 MΩ (Megaohm)
- Acqua Milli-Q
- Acqua Super-Q
- Acqua sterile per biologia molecolare

Avvio del sistema MiSeq

NOTA
Illumina raccomanda di lasciare lo strumento sempre acceso. Tuttavia, se lo strumento deve essere spento, attenersi alla procedura descritta in *Spegnimento dello strumento* a pagina 81. Attendere ***almeno*** 60 secondi prima di riaccenderlo portando l'interruttore di alimentazione su ON.

1 Se il sistema MiSeq non è già acceso, portarsi sul lato destro dello strumento per individuare l'interruttore di alimentazione sul pannello posteriore. L'interruttore è situato nell'angolo in basso al di sopra del cavo di alimentazione.

Figura 1 Posizione dell'interruttore di alimentazione



2 Portare l'interruttore di alimentazione in posizione **ON** (Acceso). Il computer integrato dello strumento si avvia.

3 Accedere al sistema operativo usando il nome utente e la password predefiniti:
- Nome utente: sbsuser
- Password: sbs123

Attendere che il sistema operativo completi il caricamento. Quando il sistema è pronto, il Software di controllo MiSeq (MCS) si avvia ed esegue automaticamente l'inizializzazione del sistema.
Al termine dell'inizializzazione viene visualizzata la schermata di benvenuto.

Concetti di MiSeq

I seguenti concetti e termini sono utilizzati per eseguire le fasi di impostazione sul sistema MiSeq.

Concetto	Descrizione
Flusso di lavoro di analisi	Una procedura di analisi secondaria eseguita da MiSeq Reporter. Il flusso di lavoro di analisi per ciascuna corsa è indicato nel foglio campioni.
Manifest	Il file che specifica un genoma di riferimento e le regioni di riferimento mirate da usare nella fase di allineamento. Per i flussi di lavoro che richiedono un file manifest, il file manifest è specificato nel foglio campioni e copiato nella cartella manifest designata in MCS.
Genoma di riferimento	Un file formato FASTA che contiene le sequenze genomiche usate durante l'analisi. Per la maggior parte dei flussi di lavoro di analisi, il file del genoma di riferimento è specificato nel foglio campioni.
Cartella delle corse	La struttura della cartella popolata dal software di analisi primaria RTA (cartella MiSeqOutput) o la cartella popolata da MiSeq Reporter (MiSeqAnalysis). Per maggiori informazioni, vedere *Cartelle delle corse* a pagina 32.
Foglio campioni	Un file *.csv (comma separated values, valori separati da virgola) che contiene le informazioni necessarie per impostare e analizzare una corsa di sequenziamento, compreso un elenco dei campioni e le relative sequenze d'indice. Il foglio campioni deve essere fornito durante le fasi di impostazioni della corsa su MiSeq. Una volta avviata la corsa, il foglio campioni viene rinominato SampleSheet.csv e copiato nelle cartelle delle corse: MiSeqTemp, MiSeqOutput e MiSeqAnalysis.

Per maggiori informazioni sui flussi di lavoro di analisi e sui formati file manifest, vedere la *Guida per l'utente di MiSeq Reporter (n. codice 15042295)*.

Per ulteriori informazioni sui fogli campioni, vedere la *Guida di consultazione rapida del foglio campioni MiSeq (n. codice 15028392)*.

Software MiSeq

Sul computer dello strumento sono installate tre applicazioni software:

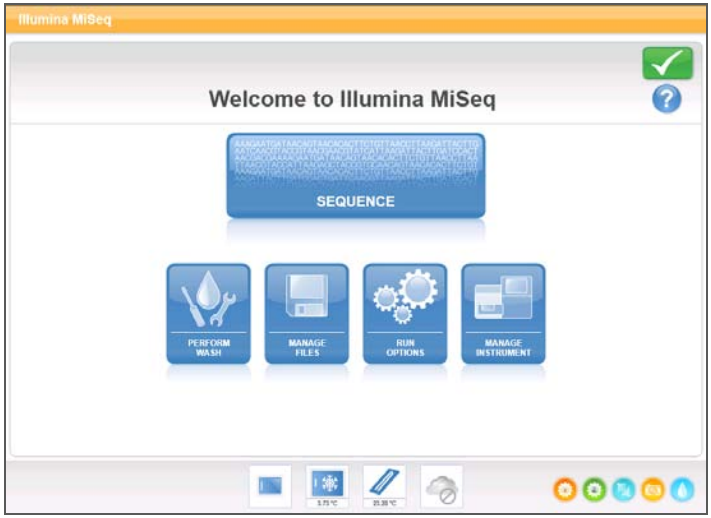
- **Software di controllo MiSeq (MCS)**: comanda il funzionamento dello strumento. L'interfaccia del software di controllo MiSeq (MCS) guida l'utente lungo l'intera procedura per caricare la cella a flusso e i reagenti prima di avviare la corsa. Una panoramica delle statistiche qualitative viene visualizzata man mano che la corsa procede.
  Durante la corsa, MCS agisce sul piano portacelle, eroga i reagenti, controlla le temperature della cella a flusso e acquisisce le immagini dei cluster sulla cella a flusso. MCS esegue la corsa secondo i parametri specificati nel foglio campioni.
- **Real-time analysis (RTA)**: esegue l'analisi primaria. Il software integrato per l'analisi primaria RTA (Real Time Analysis) esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi e assegna un punteggio qualitativo a ciascuna base per ciascun ciclo.
  Le immagini vengono temporaneamente memorizzate nella cartella della corsa per essere analizzate dal software RTA e sono automaticamente cancellate al termine dell'analisi.
- **MiSeq Reporter**: esegue l'analisi secondaria. Il software di analisi secondaria MiSeq Reporter elabora le identificazioni delle basi generate durante l'analisi primaria e produce informazioni su allineamento, varianti e gruppi di contig per ciascun genoma richiesto. Il flusso di lavoro specificato nel foglio campioni determina il tipo di analisi eseguita. Per maggiori informazioni, vedere *Panoramica su MiSeq Reporter* a pagina 31.

Il software opzionale non integrato nello strumento include il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV, Sequencing Analysis Viewer). Per maggiori informazioni, vedere *Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV)* a pagina 27.

Schermata Welcome (Benvenuto)

All'avvio del software, l'interfaccia di MCS si apre sulla schermata Welcome (Benvenuto).

Figura 2 Schermata Welcome (Benvenuto)



- **Sequence** (Sequenziamento): questa opzione apre una serie di schermate che guidano l'utente nell'impostazione della corsa. Vedere *Schermate per l'impostazione della corsa* a pagina 18.
- **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio): fornisce opzioni per avviare due tipi di lavaggi dello strumento, un lavaggio di manutenzione o un lavaggio di standby. Vedere *Lavaggi dello strumento* a pagina 65.
- **Manage Files** (Gestione file): questa opzione consente di accedere ai comandi per spostare, caricare o eliminare i file sul computer dello strumento. Vedere *Schermata Manage Files (Gestione file)* a pagina 19.
- **Run Options** (Opzioni corsa): consente di accedere alle opzioni per il lavaggio post-corsa, per cambiare i percorsi predefiniti per le cartelle dei dati e per specificare le procedure per la notifica email. Vedere *Schermata Run Option (Opzioni corsa)* a pagina 22.
- **Manage Instrument** (Gestione strumento): consente di accedere a opzioni per andare alle impostazioni del sistema, eseguire una verifica del sistema, aggiornare

manualmente il software e riavviare o spegnere lo strumento. Vedere *Schermata Manage Instrument (Gestione strumento)* a pagina 26.

- **Updates Available** (Aggiornamenti disponibili): questa opzione appare sulla schermata Welcome (Benvenuto) solo se è disponibile un aggiornamento software. Per abilitare questa opzione, il sistema MiSeq deve essere collegato a una rete con accesso a Internet. Vedere *Aggiornamenti software* a pagina 80.

Indicatori di attività

Nell'angolo inferiore destro di ciascuna schermata dell'interfaccia sono presenti una serie di icone. Ciascuna icona è un indicatore che segnala all'utente quale attività sta eseguendo lo strumento.

Figura 3 Indicatori di attività

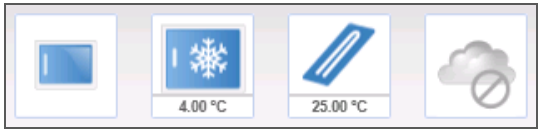
Da sinistra a destra, gli indicatori segnalano le seguenti attività:

- Spostamento del piano Y
- Spostamento del piano Z
- Attivazione dell'elettronica
- Uso della videocamera
- Pompaggio nel sistema di fluidica

Indicatori di rilevamento

Alla base di ciascuna schermata dell'interfaccia si trovano quattro indicatori di rilevamento che rappresentano lo stato di un componente del sistema.

Figura 4 Indicatori di rilevamento



Da sinistra a destra, gli indicatori di rilevamento segnalano lo stato dei seguenti componenti:

- Sportello dello scomparto della cella a flusso in posizione chiusa o aperta
- Temperatura del vano refrigerato per i reagenti in °C

- Temperatura della cella a flusso in °C
- Stato della connessione a BaseSpace® (stato "non connesso" nella figura)

Icone di stato

Nell'angolo superiore destro della schermata di benvenuto è visualizzata un'icona di stato che segnala eventuali cambiamenti delle condizioni operative durante l'impostazione o l'esecuzione della corsa.

Icona di stato	Nome dello stato	Descrizione
	Stato OK	Nessun cambiamento. Le condizioni del sistema sono normali.
	Attenzione	Informazioni importanti. Si raccomanda un intervento.
	Avvertenza	Le avvertenze non interrompono una corsa. Tuttavia, alcune avvertenze richiedono un intervento prima di poter procedere.
	Errore	In genere gli errori provocano l'arresto della corsa, che potrà continuare solo dopo un intervento dell'utente.

Quando si verifica un cambiamento nelle condizioni operative, l'icona cambia per mostrare l'immagine associata e lampeggia per avvertire l'utente. Selezionare l'icona per aprire la finestra di stato e visualizzare una descrizione della condizione.

- Selezionare le voci elencate nella finestra per visualizzare una descrizione dettagliata della condizione verificatasi ed eventualmente le istruzioni per risolvere il problema.
- Selezionare **Acknowledge** (Accetta) per confermare di aver letto il messaggio e **Close** (Chiudi) per chiudere la finestra di dialogo.

È possibile filtrare il tipo di messaggi che appaiono nella finestra di stato selezionando le icone situate lungo il margine superiore della finestra. Selezionare un'icona per mostrare/nascondere la condizione associata.

Schermate per l'impostazione della corsa

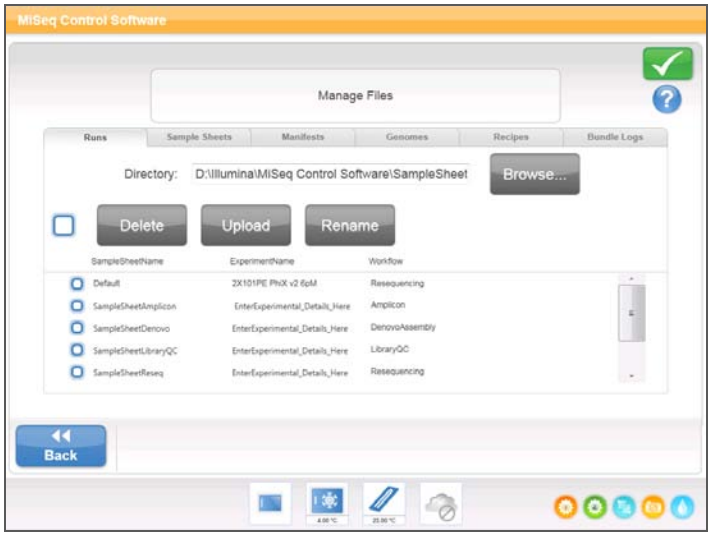
Quando si seleziona **Sequence** (Sequenziamento) sulla schermata Welcome (Benvenuto), viene visualizzata una serie di schermate nel seguente ordine: BaseSpace Option, Load Flow Cell, Load Reagents, Review e Pre-Run Check (Opzione BaseSpace, Caricamento cella

a flusso, Caricamento reagenti, Revisione e Verifica pre-corsa). Per maggiori informazioni, vedere *Impostazione di una corsa utilizzando MCS* a pagina 43

Schermata Manage Files (Gestione file)

Utilizzare le funzioni della schermata Manage Files (Gestione file) per spostare, caricare o eliminare i file sul computer dello strumento. La schermata presenta sei schede: Runs, Sample Sheets, Manifests, Genomes e Recipes e Bundle Logs (Corse, Fogli campioni, File manifest, Genomi, Ricette e Raggruppamento log).

Figura 5 Schermata Manage Files (Gestione file)



Opzioni Gestione file

Da qualsiasi scheda della schermata Manage Files (Gestione file), selezionare **Browse** (Sfoglia) per visualizzare qualsiasi file accessibile allo strumento.

Scheda	Caratteristiche
Runs (Corse)	Delete (Elimina) o Move (Sposta)
Sample Sheets (Fogli campioni)	Delete (Elimina), Upload (Carica) o Rename (Rinomina)
Manifests (File manifest)	Delete (Elimina) o Upload (Carica)
Genomes (Genomi)	Delete (Elimina) o Upload (Carica)
Recipes (Ricette)	Delete (Elimina) o Upload (Carica)
Bundle Logs (Raggruppa log)	Bundle Logs (Raggruppa log)

- **Delete** (Elimina): selezionare la casella di controllo accanto al file o alla cartella elencata e poi selezionare **Delete** (Elimina). La funzione di eliminazione è disponibile in tutte le schede fatta eccezione per Bundle Logs (Raggruppa log).
- **Move** (Sposta): disponibile solo per le cartelle delle corse. Selezionare la casella di controllo accanto alla cartella e poi scegliere **Move** (Sposta) e scegliere una posizione appropriata. La funzione **Move** (Sposta) *copia* la cartella della corsa nella nuova posizione indicata e poi la *elimina* dalla posizione precedente.
- **Select All Files** (Seleziona tutti i file): selezionare la casella di controllo a sinistra del pulsante Delete (Elimina), quindi scegliere l'azione da eseguire, Delete (Elimina) o Move (Sposta). Eliminazione o spostamento. L'azione scelta viene quindi applicata alla totalità dei file o delle cartelle.
- **Upload Files** (Carica file): disponibile per fogli campioni, file manifest, genomi e ricette. Se MiSeq non è connesso a una rete, utilizzare questa funzione per caricare i file nel computer dello strumento da un dispositivo USB. Selezionare **Upload** (Carica) e cercare nel dispositivo USB i file desiderati. Il file viene quindi caricato nella cartella indicata nel campo Directory.
- **Rename** (Rinomina): disponibile unicamente per i fogli campioni. Selezionare la casella di controllo accanto al file del foglio campioni e poi scegliere **Rename**

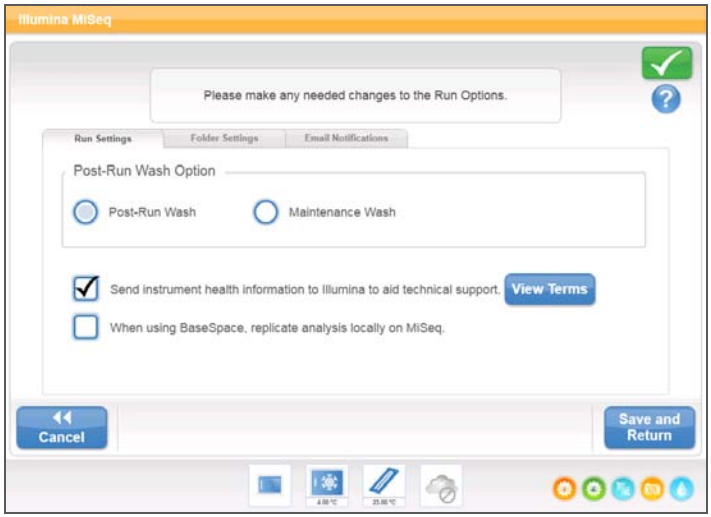
(Rinomina). Utilizzare la tastiera sullo schermo per assegnare un altro nome al foglio campioni.

- **Bundle Logs** (Raggruppa log): questo comando raggruppa e comprime in formato zip gruppi di file richiesti dall'Assistenza tecnica Illumina per la risoluzione dei problemi. Per maggiori informazioni, vedere *Bundle Logs (Raggruppa log) per la risoluzione dei problemi* a pagina 85.

Schermata Run Option (Opzioni corsa)

La schermata Run Options (Opzioni corsa) presenta tre schede che permettono di specificare le impostazioni predefinite per una corsa: Run Settings, Folder Settings e Email Notifications (Impostazioni corsa, Impostazioni cartelle e Notifiche email).

Figura 6 Scheda Run Settings (Impostazioni corsa) sulla schermata Run Options (Opzioni corsa)



Scheda Run Settings (Impostazioni corsa)

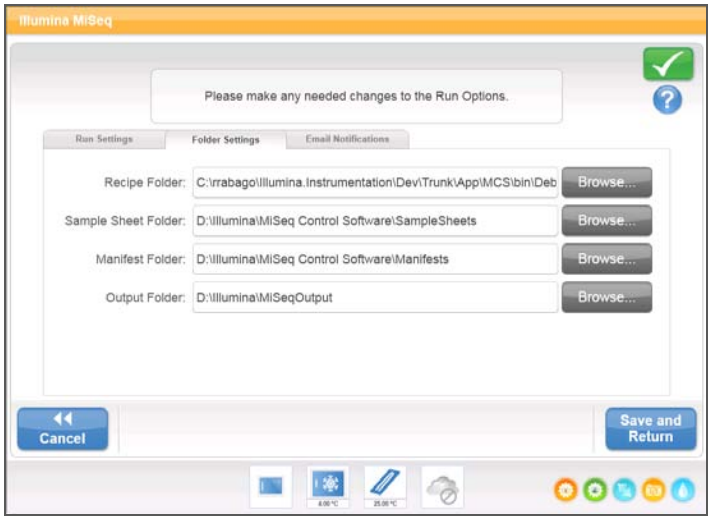
- **Post-Run Wash Option** (Opzione Lavaggio post-corsa): dopo ciascuna corsa è obbligatorio un lavaggio dello strumento. Il software richiede un lavaggio prima di impostare una corsa successiva. Si può specificare il tipo di lavaggio eseguito per impostazione predefinita. Un lavaggio post-corsa impiega circa 30 minuti. Un lavaggio di manutenzione impiega circa 1 ora.
- **Send Instrument Health** (Invia rapporti su stato integrità dello strumento): Illumina consiglia di selezionare questa opzione per aiutare l'Assistenza tecnica di Illumina nella risoluzione di eventuali problemi. Gli unici file inviati a Illumina sono i file di registro (file InterOp e file di registro). Lo strumento deve essere collegato a una rete con accesso a Internet per utilizzare questa funzione.
- **Replicate Analysis Locally** (Ripeti l'analisi in locale): questa impostazione fornisce la possibilità di eseguire l'analisi sia in locale sullo strumento che in BaseSpace.

- Se si sta utilizzando BaseSpace e si seleziona questa opzione, dopo la corsa MiSeq Reporter si aprirà automaticamente ed eseguirà l'analisi in locale.
- Se si sta utilizzando BaseSpace e non si seleziona questa opzione, dopo la corsa MiSeq Reporter non si aprirà automaticamente e l'analisi sarà eseguita solo in BaseSpace.
- Selezionare questa opzione, se si esegue il flusso di lavoro VeriSeq con BlueFuse Multi.

Scheda Folder Settings (Impostazioni cartelle)

Nella schermata Folder Settings (Impostazioni cartelle) è possibile impostare i percorsi predefiniti delle cartelle. Le cartelle possono trovarsi su una rete locale o su un computer dello strumento.

Figura 7 Scheda Folder Settings (Impostazioni cartelle)



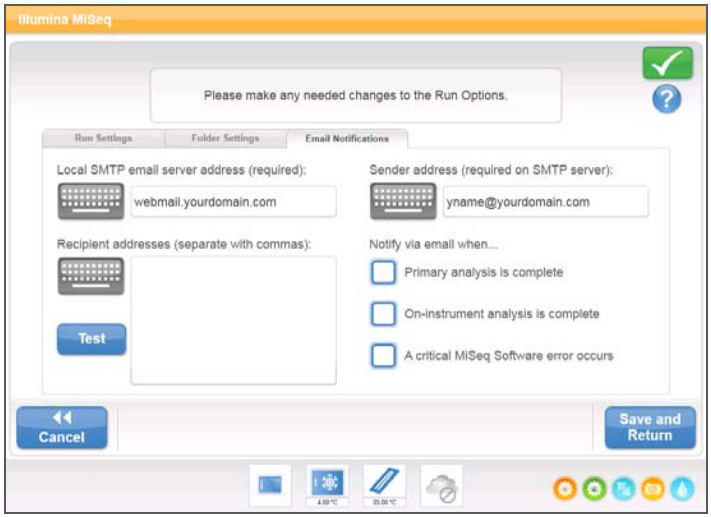
- **Recipes** (Ricette): imposta il percorso predefinito delle ricette. Le ricette sono file XML usati dal software per eseguire la corsa di sequenziamento. Una ricetta è creata all'avvio di una corsa in base ai parametri contenuti nel foglio campioni e quando la ricetta viene copiata nel folder di output.
- **Sample Sheets** (Fogli campioni): imposta il percorso predefinito per i fogli campioni. I fogli campioni sono creati prima della preparazione della libreria e contengono i parametri per la corsa.

- **Manifests** (File manifest): imposta il percorso predefinito per i file manifest. I file manifest sono richiesti per alcuni tipi di libreria. Vedere la documentazione relativa alla preparazione dei campioni, come anche il *Foglio campioni MiSeq - Guida di consultazione rapida. n. codice 15028392*.
- **MiSeqOutput** (Output di MiSeq): imposta il percorso predefinito per i file di output dell'analisi. Illumina consiglia di cambiare il percorso predefinito della cartella di output modificandolo in un percorso di rete per la condivisione, l'archiviazione di lungo termine e per utilizzare offline, come opzione, MiSeq Reporter.
  Per maggiori informazioni, vedere *Cartelle delle corse* a pagina 32.

Scheda Email Notifications (Notifiche email)

MiSeq può essere configurato per ricevere una notifica email al termine dell'analisi primaria, al termine dell'analisi secondaria integrata sullo strumento o quando si verifica un errore critico nel software del sistema MiSeq.

Figura 8 Scheda Email Notifications (Notifiche email)



- **Local SMTP email server address** (Indirizzo locale server email SMTP): utilizzare la tastiera sullo schermo per inserire l'indirizzo del server locale email SMTP.
  Se necessario, per queste informazioni rivolgersi all'amministratore della propria struttura.
- **Sender email address** (indirizzo email del mittente): utilizzare la tastiera sullo schermo per inserire l'indirizzo email del mittente. Può essere l'indirizzo email

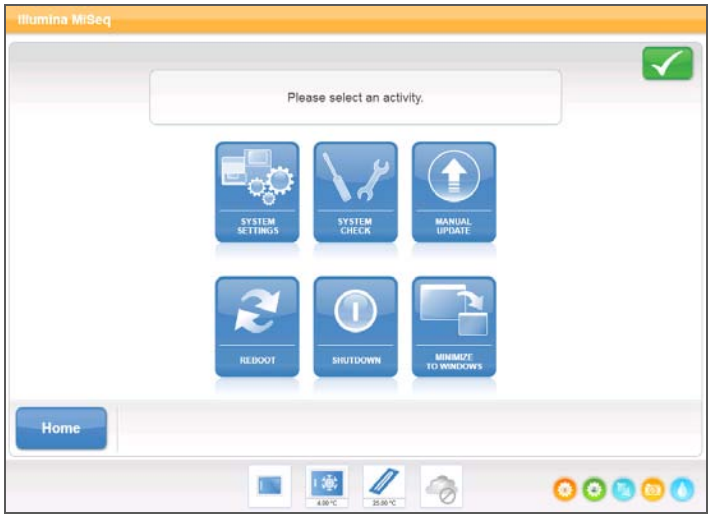
dell'utente o un altro indirizzo specificato per l'invio delle notifiche email. L'indirizzo email del mittente deve obbligatoriamente avere lo stesso nome di dominio del server email.

- **Email addresses** (Indirizzi email): utilizzare la tastiera sullo schermo per inserire gli indirizzi email di ciascun destinatario che deve ricevere le notifiche. Separare ciascun indirizzo email mediante una virgola. Selezionare **Test** (Test): per inviare un messaggio email di test ai destinatari delle notifiche.
- **Notify via email when** (Notificare via email quando): selezionare la corrispondente casella di controllo per ciascuno degli eventi della corsa che innesca una notifica.

Schermata Manage Instrument (Gestione strumento)

La schermata Manage Instrument (Gestione strumento) contiene i comandi per le impostazioni di sistema, la risoluzione dei problemi, l'aggiornamento manuale del software e per riavviare o arrestare il software dello strumento.

Figura 9 Schermata Manage Instrument (Gestione strumento)



- **System Settings** (Impostazioni di sistema): consente di accedere alle opzioni per modificare l'indirizzo IP, il nome del computer o il dominio. Vedere *Schermata System Settings (Impostazioni di sistema)* a pagina 87.
- **System Check** (Verifica sistema): fornisce opzioni per la verifica dello stato di funzionamento dei componenti del sistema. Vedere *Schermata System Check (Verifica sistema)* a pagina 89.
- **Manual Update** (Aggiornamento manuale): consente di accedere all'opzione per aggiornare manualmente il software sul computer dello strumento. Vedere *Schermata Manual Update (Aggiornamento manuale)* a pagina 80.
- **Reboot** (Riavvia) - consente di riavviare in modo sicuro il software di sistema, se necessario per la risoluzione dei problemi.
- **Shut Down** (Spegnimento): consente di spegnere il software di controllo e Windows sul computer dello strumento. Vedere *Spegnimento dello strumento* a pagina 81.

- **Minimize to Windows** (Ridurre a Windows): fornisce un accesso rapido al sistema operativo dello strumento e alle cartelle sul computer dello strumento quando si sta eseguendo MCS in modalità "kiosk" piuttosto che in modalità Windows.

Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV)

È possibile monitorare con maggiore dettaglio la corsa senza interferire con la stessa utilizzando il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV, Sequencing Analysis Viewer) Illumina. Il sistema MiSeq deve essere collegato in rete per poter visualizzare i risultati dell'analisi primaria con il Visualizzatore (SAV).

SAV permette di valutare le metriche durante una corsa mentre sono generate e successivamente dopo il termine della corsa. Installare SAV su un computer indipendente da MiSeq con accesso alla stessa rete collegata allo strumento. Dopo l'avvio dell'applicazione, consultare la cartella di output della corsa in esecuzione.

Dopo la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster, il Visualizzatore fornisce le metriche generate dal software RTA e le organizza in diagrammi, grafici e tabelle.

NOTA

Il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) è compatibile con tutti i sistemi di sequenziamento Illumina, che usano nella maggior parte dei casi una cella a flusso a otto corsie. Alcune schermate includono elenchi a discesa che mostrano le corsie da 1 a 8. La cella a flusso di MiSeq è a singola corsia, pertanto i dati appaiono sia quando si seleziona **All** (Tutte) sia quando si seleziona **Lane 1** (Corsia 1).

Per maggiori informazioni, vedere la *Guida per l'utente del Visualizzatore analisi di sequenziamento, n. codice 15020619*.

Durata della corsa

La durata della corsa dipende dal numero di cicli eseguiti. Si può eseguire una corsa paired-end fino a 2 x 301 cicli di sequenziamento più qualsiasi Lettura indici (Index Reads) con MCS v2.3.

Inoltre, la durata della corsa dipende dalla versione dei reagenti MiSeq che si stanno utilizzando e dagli eventuali upgrade per il miglioramento delle prestazioni installati sullo strumento.

Per le durate attese e altre specifiche, visitare la pagina delle specifiche del sistema MiSeq sul sito Web Illumina (www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn).

Numero di cicli di sequenziamento di una lettura

Il numero di cicli eseguiti in una lettura è pari a un ciclo in più rispetto al numero di cicli analizzati. Il ciclo extra è necessario per calcoli di determinazione delle fasi (phasing) e di predeterminazione delle fasi (prephasing).

Ad esempio, una corsa paired-end da 300 cicli esegue due letture da 301 cicli (2 x 301) con un totale di 602 cicli. Al termine della corsa, si analizzano 2 x 300 cicli.

Opzioni per l'analisi secondaria

I dati di sequenziamento del sistema MiSeq possono essere analizzati sul computer dello strumento utilizzando MiSeq Reporter o sul cloud utilizzando BaseSpace. Se si esegue il flusso di lavoro VeriSeq, utilizzare per l'analisi il software BlueFuse Multi. BaseSpace e MiSeq Reporter producono informazioni sull'allineamento, le varianti e i gruppi di contig per ciascun genoma richiesto e per ciascun campione di una corsa multi-campione.

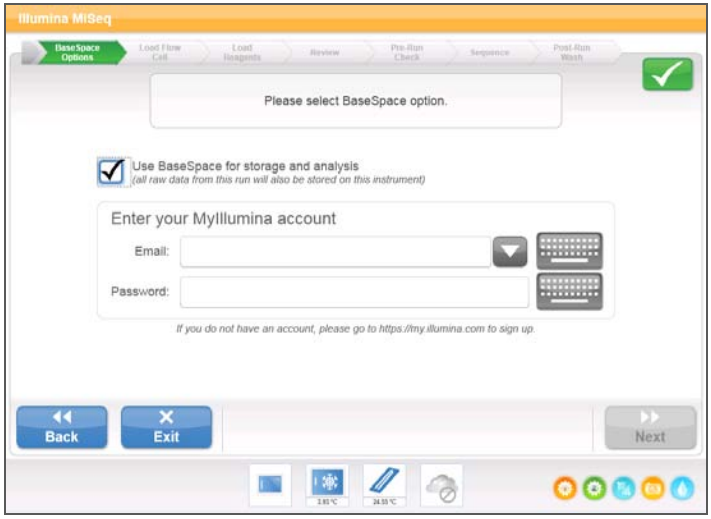
Panoramica su BaseSpace

BaseSpace è l'ambiente di calcolo sul cloud computing di Illumina. L'utilizzo di BaseSpace per memorizzare e analizzare i dati delle corse assicura i seguenti benefici:

- Elimina la necessità di avere in sede spazio di archiviazione e capacità di calcolo
- Rende possibile la gestione e l'analisi dei dati web-based
- Permette di avviare una nuova corsa di sequenziamento mentre i dati sono analizzati
- Fornisce strumenti per la collaborazione e la condivisione globale

È possibile accedere a BaseSpace quando si imposta una corsa di sequenziamento. Quando si usa BaseSpace, è possibile impostare la corsa in modo che anche i dati non elaborati ottenuti dalla corsa siano archiviati localmente. Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Run Option (Opzioni corsa)* a pagina 22.

Figura 10 Schermata BaseSpace Option (Opzione BaseSpace)


Illumina MiSeq
BaseSpace Options
Please select BaseSpace option.
Use BaseSpace for storage and analysis
(all raw data from this run will also be stored on this instrument)
Enter your MyIllumina account
Email:
Password:
If you do not have an account, please go to https://my.illumina.com to sign up.
Back
Exit
Next

Quando si inizia la corsa di sequenziamento, l'icona di BaseSpace cambia indicando che MiSeq è connesso a BaseSpace e che i file dei dati sono trasferiti in una posizione protetta. Durante il trasferimento i file vengono cifrati, poi sono decifrati durante l'analisi e infine nuovamente cifrati all'atto dell'archiviazione.

Figura 11 Icona connesso a BaseSpace

BaseSpace si disconnette automaticamente da MiSeq al termine della corsa o non appena tutti i file dell'analisi primaria sono stati caricati. In caso di interruzione della connessione Internet, una volta ristabilita la connessione il caricamento dei file dell'analisi riprende dal punto in cui era stato interrotto.

Non appena caricato su BaseSpace l'ultimo file dell'identificazione delle basi, inizia l'analisi secondaria dei dati. Su BaseSpace sono supportati gli stessi flussi di lavoro di analisi eseguibili con l'analisi integrata sullo strumento utilizzando MiSeq Reporter.

Con l'installazione di MiSeq Reporter sono forniti diversi genomi. BaseSpace supporta solo i genomi inclusi in MiSeq Reporter.

Per connettersi a BaseSpace andare all'indirizzo https://basespace.illumina.com. Accedere usando il proprio account di login MyIllumina.

Per maggiori informazioni sull'utilizzo di BaseSpace, vedere la guida online di BaseSpace sul sito Web Illumina: www.illumina.com/help/BaseSpaceHelp/BaseSpaceHelp.htm.

Panoramica su MiSeq Reporter

MiSeq Reporter è un'applicazione basata su Windows che elabora le identificazioni delle basi generate dall'analisi primaria. MiSeq Reporter inizia l'analisi secondaria immediatamente dopo la conclusione dell'analisi primaria della corsa di sequenziamento.

MiSeq Reporter viene eseguito sul computer dello strumento. Tuttavia, l'interfaccia software è visibile solo tramite un browser Web da un altro computer che sia collegato alla stessa rete a cui è connesso MiSeq Reporter.

Al termine dell'analisi secondaria, nella cartella della corsa viene creato un file denominato CompletedJobInfo.xml. Per maggiori informazioni, vedere *Guida per l'utente di MiSeq Reporter (n. codice 15042295)*.

Sequenziamento durante l'analisi

Le risorse di calcolo del sistema MiSeq sono dedicate al sequenziamento oppure all'analisi. Se si avvia un'altra corsa di sequenziamento sul sistema MiSeq prima che l'analisi secondaria di una corsa precedente sia stata completata, l'analisi secondaria viene interrotta automaticamente.

È possibile riavviare l'analisi secondaria utilizzando la funzione Requeue (Mettere nuovamente in coda) sull'interfaccia di MiSeq Reporter dopo il completamento della nuova corsa di sequenziamento. In tal caso, l'analisi secondaria riprende dall'inizio.

Cartelle delle corse

Ciascuna corsa su sistema MiSeq genera tre cartelle della corsa, ciascuna con uno scopo specifico:

- **D:\Illumina\MiSeqTemp**: all'inizio della corsa, viene scritta sul disco locale del computer dello strumento una cartella temporanea, che è utilizzata come area di lavoro per l'MCS e l'RTA. Non è necessario accedere alla cartella MiSeqTemp (MiSeq temporanea). Dopo sette giorni il contenuto di questa cartella è eliminato.
- **D:\Illumina\MiSeqOutput**: RTA copia file dalla cartella MiSeqTemp (MiSeq temporanea) alla cartella MiSeqOutput (Output MiSeq). Mentre vengono generati file dell'analisi primaria, RTA ricopia i file nella cartella MiSeqTemp (MiSeq temporanea) e riempie la cartella Analysis (Analisi). Le immagini di focalizzazione e le immagini in miniatura non sono copiate nella cartella MiSeqAnalysis (Analisi MiSeq).
  È possibile modificare il percorso della cartella di output nel campo Output Folder (Cartella di uscita) della schermata Run Options (Opzioni corsa). Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Run Option (Opzioni corsa)* a pagina 22.
- **D:\Illumina\MiSeqAnalysis**: al termine dell'analisi primaria, MiSeq Reporter accede alla cartella MiSeqAnalysis (Analisi MiSeq) del disco locale dello strumento per iniziare l'analisi secondaria. Tutti i file scritti nella cartella MiSeqAnalysis (Analisi MiSeq) vengono copiati nella cartella MiSeqOutput (Output MiSeq). Per maggiori informazioni, vedere *Contenuti della cartella MiSeqOutput* a pagina 33.
  Se per l'analisi si sta utilizzando BaseSpace senza replicare localmente l'analisi, la cartella MiSeqAnalysis (Analisi MiSeq) sul disco locale dello strumento è vuota.

Denominazione della cartella della corsa

Il nome della cartella della corsa individua la data della corsa, il numero dello strumento e la cella a flusso utilizzata per la corsa. Per qualsiasi corsa, ciascuna cartella della corsa ha lo stesso nome di cartella.

Per impostazione predefinita, il nome della cartella utilizza il seguente formato:

AAMMGG_<NumeroStrumento>_<Numero Corsa>_A<CodiceBarreCellaFlusso>

Il numero della corsa viene incrementato di 1 ogni volta che si esegue una corsa su un dato strumento.

Contenuti della cartella MiSeqOutput

Dopo l'analisi primaria, la cartella MiSeqOutput è popolata con i file necessari per l'analisi secondaria di MiSeq Reporter. Al termine dell'analisi secondaria, le cartelle MiSeqOutput e MiSeqAnalysis sono identiche salvo l'eccezione che la cartella MiSeqOutput contiene due sotto-cartelle per i file d'immagine: Images (Immagini) e Thumbnail_Images (Immagini in miniatura). Queste cartelle non sono richieste per l'analisi secondaria.

File

I file che sono copiati nelle cartelle dell'output e dell'analisi includono:

- **SampleSheet.csv**: fornisce i parametri per la corsa e la successiva analisi. All'avvio della corsa, il foglio campioni viene copiato nella cartella al livello base e ridenominato come SampleSheet.csv. Delle copie sono poste in Data\Intensities e Data\Intensities\BaseCalls.
- **runParameters.xml**: contiene un riassunto dei parametri della corsa e informazioni sui componenti della corsa, ad esempio l'etichetta RFID della cella a flusso e dei reagenti associati alla corsa.
- **RunInfo.xml**: contiene informazioni ad alto livello sulla corsa, ad esempio il numero di letture e cicli nella corsa di sequenziamento e se si tratta o meno di una lettura indicizzata.

Cartelle

Le cartelle che sono copiate nelle cartelle dell'output e dell'analisi includono le seguenti cartelle generate durante la corsa di sequenziamento:

- **<Nome cartella corsa>\Config**: contiene i file di configurazione per la corsa.
- **<Nome cartella corsa>\Data**: contiene le sotto-cartelle Intensities (Intensità), BaseCalls (Individuazione delle basi) e Alignment (Allineamento). I dati generati da MiSeq Reporter sono posti nella sotto-cartella Alignment.
- **<Nome cartella corsa>\Data\RTA Logs**: contiene i file di registro che descrivono ciascuna fase eseguita da RTA per ciascuna Lettura.
- **<Nome cartella corsa>\Data\Intensities\BaseCalls**: contiene le sotto-cartelle con file base call (*.bcl), matrix e phasing. MiSeq Reporter colloca i file FASTQ in questa cartella durante l'analisi secondaria. Per maggiori informazioni, vedere *Guida per l'utente di MiSeq Reporter (n. codice 15042295)*.
- **<Nome cartella corsa>\Recipe**: contiene la ricetta utilizzata per la corsa.

- **<Nome cartella corsa>\Logs**: contiene i file di registro che descrivono ciascuna fase eseguita dallo strumento per ciascun ciclo.
- **<Nome cartella corsa>\InterOp**: contiene file binari utilizzati dal Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV, Sequencing Analysis Viewer) per riassumere varie metriche dell'analisi primaria, ad esempio densità cluster, intensità, punteggi qualitativi e qualità complessiva della corsa.

Tutti gli altri file e cartelle create nella cartella temporanea della corsa non vengono copiati nelle cartelle dell'output e dell'analisi. Essi contengono file temporanei che non sono necessari per l'analisi o per la risoluzione dei problemi.

MiSeq Reporter aggiunge altre cartelle, come la cartella Alignment (Allineamento), durante l'analisi secondaria. Per maggiori informazioni, vedere *Guida per l'utente di MiSeq Reporter (n. codice 15042295)*.

Spazio su disco necessario

Il computer integrato dello strumento dispone di una capacità di memoria di circa 550 GB.

Prima di avviare una corsa, il software verifica lo spazio disponibile su disco. Se non è disponibile spazio su disco sufficiente per la corsa, viene visualizzato un messaggio del software. Il messaggio indica quanto spazio su disco è richiesto per la corsa e quando spazio su disco deve essere liberato prima di procedere con la corsa.

Se viene richiesto di liberare spazio su disco, andare alla schermata Welcome (Benvenuto) e selezionare **Manage Files** (Gestione file). Nella schermata Manage Files (Gestione file), selezionare la scheda **Runs** (Corse). Spostare o eliminare, a seconda dei casi, le cartelle delle corse meno recenti. Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Manage Files (Gestione file)* a pagina 19. Dopo avere liberato spazio su disco sufficiente, selezionare **Restart Check** (Riavvia verifica).

Capitolo 2

Esecuzione di una corsa

Introduzione 38
Flusso di lavoro MiSeq 39
Caricamento delle librerie campioni 41
Impostazione di una corsa utilizzando MCS 43
Pulizia della cella a flusso 44
Caricamento della cella a flusso 47
Caricamento dei reagenti 50
Avvio della corsa 54
Monitoraggio della corsa 56

Introduzione

Per eseguire una corsa su MiSeq, seguire le fasi d'impostazione descritte in questo capitolo. Dopo l'avvio della corsa, non è richiesto nessun altro intervento da parte dell'utente.

La corsa di sequenziamento può essere monitorata dalla schermata Sequencing (Sequenziamento) oppure in remoto utilizzando il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV, Sequencing Analysis Viewer), un'applicazione software opzionale che può essere scaricata dal sito Web Illumina.

Al termine della corsa di sequenziamento, eseguire un lavaggio dello strumento.

Flusso di lavoro MiSeq

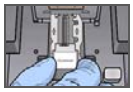
Denaturare e diluire le librerie (non si applica a tutti i tipi di libreria). Vedere *Preparazione delle librerie di DNA per il sequenziamento su MiSeq (n. codice 15039740).*

Preparare la cartuccia di reagenti pre-riempita per l'uso. Fare riferimento alla guida di preparazione dei reagenti applicabile alla cartuccia di reagenti MiSeq in uso.

Caricare la miscela di librerie nell'apposito serbatoio della cartuccia di reagenti.

Dall'interfaccia software, selezionare **Sequence** (Sequenziamento) per avviare la procedura di impostazione della corsa.

[Opzionale] Collegarsi a BaseSpace.



Lavare e asciugare accuratamente la cella a flusso.

Caricare la cella a flusso.

Caricare il flacone di PR2 e accertarsi che il flacone degli scarti sia vuoto.

Caricare la cartuccia di reagenti.

Riesaminare i parametri della corsa e i risultati della verifica pre-corsa.

Selezionare **Start Run** (Avvia corsa).

Monitorare la corsa sull'interfaccia MCS o su un altro computer utilizzando il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV, Sequencing Analysis Viewer).

Eseguire un lavaggio post-corsa.

Generazione di cluster

Durante la generazione di cluster, singole molecole di DNA si legano alla superficie della cella a flusso e in seguito vengono sottoposte ad amplificazione "a ponte" per formare i cluster.

Sequenziamento

Dopo essere stati generati, i cluster vengono sottoposti a imaging utilizzando LED e combinazioni di filtri specifici per ciascuno dei quattro dideossinucleotidi con marcatura fluorescente. Ultimato l'imaging di una delle tile, la cella a flusso viene riposizionata per l'esposizione della tile successiva. Il processo è ripetuto per ciascun ciclo di sequenziamento. Dopo l'analisi delle immagini, il software esegue l'analisi primaria, che comprende l'identificazione delle basi, il filtraggio e il calcolo dei punteggi qualitativi.

Analisi

Al termine della corsa, il software di analisi MiSeq Reporter si avvia automaticamente per eseguire l'analisi secondaria, che comprende l'allineamento e l'identificazione delle varianti. È possibile monitorare l'analisi secondaria da un altro computer via Internet. Per maggiori informazioni, vedere *Panoramica su MiSeq Reporter* a pagina 31.

Caricamento delle librerie campioni

NOTA

Se richiesto dal tipo di libreria, denaturare e diluire le librerie e aggiungere un campione di controllo PhiX facoltativo. Vedere *Preparazione delle librerie di DNA per il sequenziamento su MiSeq, n. codice 15039740*.

Questa fase non si applica a tutti i tipi di librerie. Alcuni metodi di preparazione dei campioni Illumina consentono di ottenere una concentrazione normalizzata pronta per l'uso di un insieme di librerie. Fare riferimento alla guida alla preparazione dei campioni relativa al kit utilizzato per preparare le librerie dei campioni.

NOTA

Se si utilizzano i primer custom, preparare i primer e impostare il foglio campioni come descritto in *Utilizzo di primer custom su MiSeq, n. codice 15041638*.

Quando la cartuccia dei reagenti è completamente scongelata e pronta per l'utilizzo, è possibile caricare le librerie preparate sulla cartuccia.

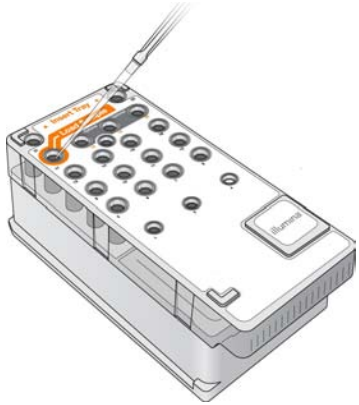
1. Usare un panno da laboratorio a bassissimo rilascio di particelle per pulire la capsula in alluminio che copre il serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Carica i campioni).
2. Utilizzare la punta di una pipetta pulita da 1 ml per forare la capsula di alluminio che sigilla il serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni).

NOTA

Non perforare nessun'altra posizione di reagenti. Le altre posizioni di reagenti sono perforate automaticamente durante la corsa di sequenziamento.

3. Pipettare 600 µl delle librerie preparate nel serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni). Non toccare la capsula in alluminio mentre si eroga il campione.

Figura 12 Caricamento delle librerie



4 Passare direttamente alla procedura di impostazione della corsa usando l'interfaccia del software di controllo MiSeq (MCS).

Impostazione di una corsa utilizzando MCS

1. Nella schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Manage Instrument** (Gestione strumento).
2. Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **Reboot** (Riavvia) per riavviare il software del sistema.
3. [Opzionale] Dalla schermata Run Options (Opzioni corsa), controllare le cartelle per le posizioni di ricette, fogli campioni, file manifest e la cartella MiSeqOutput (Output di MiSeq). Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Run Option (Opzioni corsa)* a pagina 22.
4. Dalla schermata di Welcome (Benvenuto), selezionare **Sequence** (Sequenziamento) per avviare la procedura di impostazione della corsa. Viene visualizzata la schermata BaseSpace Option (Opzione BaseSpace).
   Quando si seleziona **Sequence** (Sequenziamento) sulla schermata Welcome (Benvenuto), viene visualizzata una serie di schermate nel seguente ordine: BaseSpace Option, Load Flow Cell, Load Reagents, Review e Pre-Run Check (Opzione BaseSpace, Caricamento cella a flusso, Caricamento reagenti, Revisione e Verifica pre-corsa).

Impostazione dell'opzione BaseSpace

Per abilitare l'accesso a BaseSpace, è necessario disporre di una connessione di rete e di un account MyIllumina.

1. Dalla schermata BaseSpace Options (Opzioni BaseSpace), scegliere una delle seguenti opzioni:
   a. Selezionare la casella di controllo **Use BaseSpace for storage and analysis** (Usa BaseSpace per l'archiviazione e l'analisi). L'analisi viene eseguita in BaseSpace.
   b. Deselezionare la casella di controllo **Use BaseSpace for storage and analysis** (Usa BaseSpace per l'archiviazione e l'analisi). L'analisi viene eseguita sullo strumento.
2. Selezionare **Next** (Avanti). Viene visualizzata la schermata Load Flow Cell (Caricamento cella a flusso).

Pulizia della cella a flusso

La cella a flusso viene fornita in un apposito contenitore, immersa in un tampone di conservazione.

Il colore del tappo del contenitore della cella indica il tipo di cella a flusso:

- Il tappo del contenitore della cella a flusso standard è trasparente.
- Il tappo del contenitore della cella a flusso per PGS è trasparente.
- Il tappo del contenitore della cella a flusso micro è verde.
- Il tappo del contenitore della cella a flusso nano è giallo.

1 Indossare un nuovo paio di guanti privi di polvere.

2 Con una pinza di plastica, afferrare la cella a flusso dalla base della relativa cartuccia in plastica ed estrarla dal contenitore.

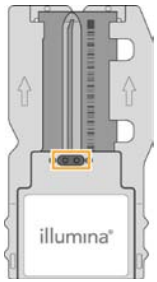
Figura 13 Rimozione della cella a flusso

3 Sciacquare delicatamente la cella a flusso con acqua da laboratorio, assicurandosi di aver eliminato accuratamente i sali in eccesso dal vetro e dalla cartuccia di plastica. I sali in eccesso possono impedire il corretto posizionamento della cella a flusso sullo strumento. Se i sali si asciugano nell'area di imaging, questo incide anche sull'imaging.

Figura 14 Risciacquo della cella a flusso

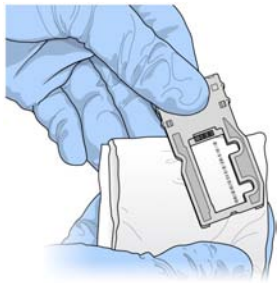
4 Prestando particolare attenzione intorno alla guarnizione nera della porta della cella a flusso, asciugare con cura la cella a flusso e la cartuccia con un panno pulente per lenti che non lasci residui. Asciugare tamponando delicatamente l'area della guarnizione e il vetro adiacente.

Figura 15 Porte e guarnizione della cella a flusso



5 Con una salvietta imbevuta di alcol, pulire il vetro della cella a flusso. Assicurarsi di non lasciare striature e impronte sul vetro e che sia completamente privo di particelle estranee o fibre di tessuto. Evitare di passare la salvietta imbevuta di alcol sulla guarnizione della porta della cella a flusso.

Figura 16 Asciugatura della cella a flusso

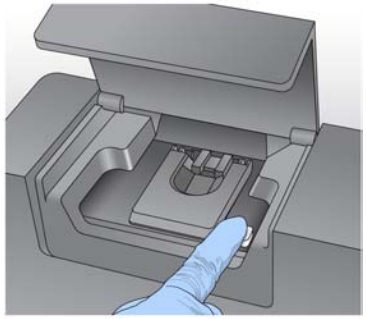


6 Asciugare l'eventuale alcol in eccesso con un panno pulente per lenti che non lasci residui. Ispezionare visivamente la cella a flusso per accertarsi che la guarnizione aderisca bene intorno alle porte e che quest'ultime non siano ostruite.
Se la guarnizione sembra anche leggermente scostata, riposizionarla esercitando una leggera pressione fino a farla aderire stabilmente alle porte della cella a flusso.

Caricamento della cella a flusso

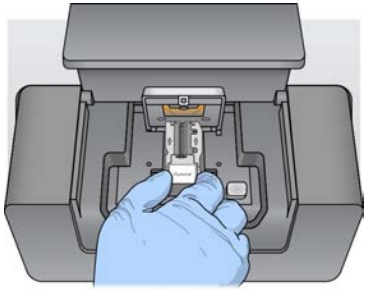
La schermata Load Flow Cell (Caricamento cella a flusso) invita l'utente a caricare la cella a flusso.

Figura 17 Apertura del coperchio a scatto



1. Ispezionare visivamente il piano portacelle per verificare che sia esente da residui. Se si riscontra la presenza di fibre o altre particelle estranee, pulire il piano portacelle con una salvietta imbevuta di alcol o un panno che non lascia residui imbevuto di etanolo o isopropanolo. Strofinare delicatamente la superficie del piano portacelle finché non è perfettamente pulita e asciutta.
2. Sollevare lo sportello dello scomparto della cella a flusso, poi premere il pulsante di sblocco a destra del coperchio a scatto della cella a flusso. Il coperchio a scatto della cella a flusso si apre.
3. Tenendo la cella per i bordi della cartuccia della cella a flusso, posizionare la cella a flusso sul piano portacelle.

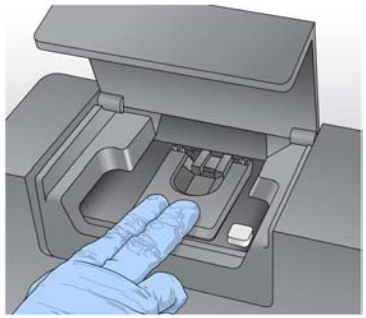
Figura 18 Posizionamento della cella a flusso sul piano portacelle



4 Premere delicatamente il coperchio a scatto per abbassarlo sulla cella a flusso.

NOTA
Quando il coperchio a scatto viene chiuso, due perni di allineamento accanto alla cerniera posizionano e allineano correttamente la cella a flusso. Quando si sente un 'clic' vuol dire che il coperchio a scatto è chiuso correttamente.

Figura 19 Chiusura del coperchio a scatto



5 Verificare i dati visualizzati nell'angolo inferiore sinistro della schermata per accertarsi che l'etichetta RFID della cella a flusso è stata letta correttamente.

NOTA
Se l'etichetta RFID non può essere letta, il software guida l'utente nei passaggi per ottenere un codice temporaneo di bypass e continuare con l'impostazione della corsa. Per maggiori informazioni, vedere *Risoluzione degli errori di lettura dell'etichetta RFID* a pagina 97.

6 Chiudere lo sportello dello scomparto della cella a flusso.

7 Selezionare **Next** (Avanti) nella schermata Load Flow Cell (Caricamento cella a flusso). Si apre la schermata Load Reagents (Caricamento reagenti).

Caricamento dei reagenti

Il caricamento dei reagenti prevede due passaggi. Dapprima, si carica il flacone di PR2 e si verifica che il flacone degli scarti sia vuoto quindi si carica la cartuccia di reagenti.

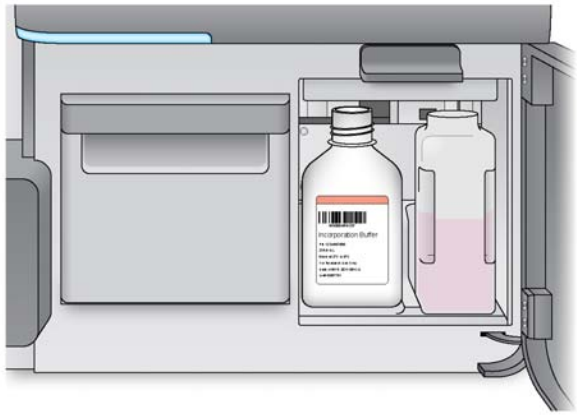
NOTA

Utilizzare sempre la cartuccia di reagenti associata con il tipo di cella a flusso caricata. Se la cartuccia di reagenti non è compatibile, viene visualizzato un messaggio di errore sulla schermata. Selezionare **Back** (Indietro) per caricare la cartuccia compatibile o selezionare **Exit** (Esci) per tornare alla schermata di benvenuto.

Caricamento del flacone di PR2 e verifica del flacone degli scarti

1. Rimuovere il flacone di PR2 dal luogo di conservazione tra 2 °C e 8 °C. Capovolgere delicatamente il flacone per miscelare il contenuto del flacone di PR2 e poi rimuovere il coperchio.
2. Aprire lo sportello dello scomparto reagenti.
3. Sollevare la maniglia del pettine di aspirazione finché non si blocca in sede.
4. Collocare il flacone di PR2 nell'incavo a destra del vano refrigerato per i reagenti.

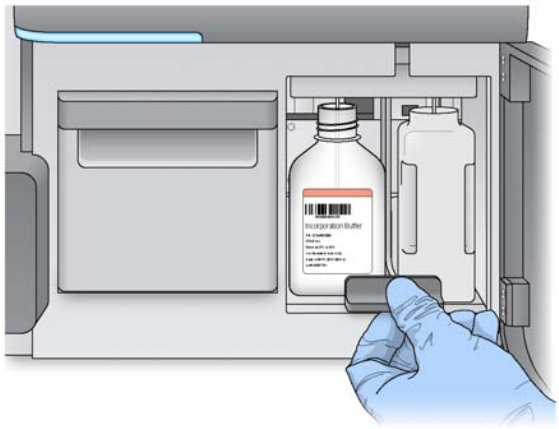
Figura 20 Caricamento del flacone di PR2



5 Verificare che il flacone degli scarti sia vuoto. Nel caso non sia vuoto, vuotarne il contenuto nell'appropriato contenitore per gli scarti.

6 Abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione. Accertarsi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di PR2 e degli scarti.

Figura 21 Abbassamento della maniglia del pettine di aspirazione



7 Verificare i dati visualizzati nell'angolo inferiore sinistro della schermata per accertarsi che l'etichetta RFID del flacone di PR2 sia stata letta correttamente.

NOTA
Se l'etichetta RFID non può essere letta, il software guida l'utente nei passaggi per ottenere un codice temporaneo di bypass e continuare con l'impostazione della corsa. Per maggiori informazioni, vedere *Risoluzione degli errori di lettura dell'etichetta RFID* a pagina 97.

8 Selezionare **Next** (Avanti) nella schermata Load Reagents (Caricamento reagenti).

Caricamento della cartuccia di reagenti

NOTA
Non lasciare lo sportello del vano refrigerato aperto per periodi prolungati.

1 Aprire lo sportello del vano refrigerato per i reagenti.

2 Afferrare la cartuccia di reagenti dall'estremità con l'etichetta Illumina e farla scorrere all'interno del vano refrigerato finché non si arresta.

Figura 22 Caricamento della cartuccia di reagenti

3 Chiudere lo sportello del vano refrigerato.

4 Verificare i dati visualizzati nell'angolo inferiore sinistro della schermata per accertarsi che l'etichetta RFID della cartuccia di reagenti sia stata letta correttamente.

NOTA
Se l'etichetta RFID non può essere letta, il software guida l'utente nei passaggi per ottenere un codice temporaneo di bypass e continuare con l'impostazione della corsa. Per maggiori informazioni, vedere *Risoluzione degli errori di lettura dell'etichetta RFID* a pagina 97.

Se la cartuccia di reagenti non è compatibile con la cella a flusso, viene visualizzato un messaggio. Selezionare **Back** (Indietro) per caricare una cartuccia compatibile o selezionare **Exit** (Esci) per tornare alla schermata di benvenuto.

5 Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

6 Selezionare **Next** (Avanti) nella schermata Load Reagents (Caricamento reagenti). Si apre la schermata Review (Revisione).

Opzione Change Sample Sheet (Cambia foglio campioni)

A ogni corsa deve essere associato un foglio campioni. Per impostazione predefinita, il software cerca il file del foglio campioni con un nome che corrisponde al numero del codice a barre della cartuccia di reagenti caricata sullo strumento. Se non viene individuato un foglio campioni, viene visualizzato un messaggio che inviata l'utente a cercare la posizione in cui si trova il foglio campioni corretto per la corsa.

Per impedire al software di cercare senza risultati, utilizzare il comando **Change Sample Sheet** (Cambia foglio campioni) nella schermata Load Reagents (Caricamento reagenti) per indirizzare il software al foglio campioni corretto.

Avvio della corsa

Dopo aver caricato la cella a flusso e i reagenti riesaminare i parametri della corsa ed eseguire una verifica pre-corsa prima di avviare la corsa.

Revisione dei parametri della corsa

1. Rivedere il nome assegnato all'esperimento, il flusso di lavoro scelto per l'analisi e la lunghezza delle letture. Questi parametri sono specificati nel foglio campioni.
2. Rivedere i percorsi delle cartelle nell'angolo inferiore sinistro.
   Per eventuali modifiche, selezionare **Change Folders** (Cambia cartelle). Al termine delle modifiche, selezionare **Save** (Salva) e successivamente **Next** (Avanti).
3. Selezionare **Next** (Avanti). Si apre la schermata Pre-Run Check (Verifica pre-corsa).

Opzione Change Folders (Cambia cartelle)

Nell'angolo inferiore sinistro della schermata Review (Revisione) sono elencati i percorsi correnti delle cartelle contenenti le ricette, i fogli campioni, i file manifest, nonché il percorso della cartella di output. Se si desidera modificare i percorsi delle cartelle, selezionare **Change Folders** (Cambia cartelle) e navigare fino a individuare un percorso preferito. Questa opzione della schermata Review (Revisione) consente di cambiare i percorsi delle varie cartelle unicamente per la corsa corrente.

Revisione della verifica pre-corsa

Il sistema verifica tutti i componenti della corsa, lo spazio su disco e le connessioni di rete prima di avviare la corsa.

Se uno o più degli elementi controllati non superano la verifica pre-corsa, appare un messaggio con le istruzioni per correggere l'errore. Per maggiori informazioni, vedere *Risoluzione degli errori d'impostazione corsa* a pagina 95.

Dopo che tutte le voci hanno superato con successo la verifica pre-corsa, selezionare **Start Run** (Avvia corsa).

Note importanti prima di avviare la corsa

AVVERTENZA

Il sistema MiSeq è sensibile alle vibrazioni. Toccare lo strumento dopo l'avvio della corsa può incidere negativamente sui risultati del sequenziamento.

Dopo aver selezionato **Start Run** (Avvia corsa), non aprire gli sportelli dello scomparto della cella a flusso o dei reagenti, né toccare il monitor dello strumento a meno che non si desideri sospendere la corsa. Per maggiori informazioni, vedere *Sospensione di una corsa* a pagina 92.

AVVERTENZA

Assicurarsi di chiudere tutti i file su MiSeq prima di avviare una corsa e non riaprirli durante la corsa.

Monitoraggio della corsa

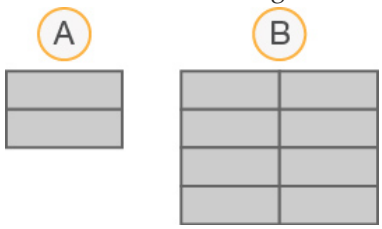
1 Durante la corsa, monitorarne l'avanzamento, le intensità e i punteggi qualitativi sulla schermata Sequencing (Sequenziamento). La schermata Sequencing (Sequenziamento) è è di sola visualizzazione.

Per monitorare con maggiore dettaglio la corsa, utilizzare il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) installato su un altro computer indipendente da quello dello strumento. Occorre una connessione alla rete.

In alternativa, se siete connessi a BaseSpace, è possibile monitorare la corsa usando SAV in BaseSpace.

- **Run Progress** (Avanzamento della corsa): mostra a che punto è giunta la corsa in una barra di stato ed elenca il numero di cicli completati.
- **Intensity** (Intensità): mostra il valore delle intensità dei cluster per il 90° percentile di ogni tile.

  Il grafico dell'area Intensity (Intensità) rappresenta il numero di tile e il numero di superfici sottoposti a imaging.
  - Se la cella a flusso è sottoposta a imaging solo sulla superficie superiore, viene visualizzato un grafico a colonna singola.
  - Se la cella a flusso è sottoposta a imaging sulla superficie superiore e inferiore, viene visualizzato un grafico a colonna doppia.



A Indica due tile, solo superficie superiore
B Indica quattro tile, superficie superiore e inferiore

- **Q-Score All Cycles** (Punteggi qualitativi per tutti i cicli): mostra la percentuale media di basi con punteggio qualitativo superiore a Q30. Un punteggio qualitativo è una predizione della probabilità di un'errata identificazione delle basi. I punteggi qualitativi (Q-score) sono calcolati dopo il ciclo 25.

Punteggio qualitativo	Probabilità di errata identificazione delle basi
Q40	1 su 10.000
Q30	1 su 1.000
Q20	1 su 100
Q10	1 su 10

- **Cluster Density (K/mm²)** (Densità dei cluster - K/mm²): mostra il numero di cluster per millimetro quadrato, per la corsa.
- **Clusters Passing Filter (%)** (Cluster che attraversano il filtro - %): mostra la percentuale di cluster che attraversano il filtro basata sul filtro chastity Illumina, che misura la qualità. Questi dati appaiono solo dopo il ciclo 25.

  NOTA
  Il valore chastity di un'identificazione delle basi è dato dal rapporto di intensità tra il segnale maggiore diviso per la somma dei due segnali maggiori. Le letture non superano il filtro qualità se sono presenti una o più identificazioni delle basi con valore "chastity" inferiore a 0,6 durante i primi 25 cicli.

- **Estimated Yield (Mb)** (Resa prevista - Mb): mostra il numero atteso di basi identificate per la corsa, misurato in megabasi. Questi dati appaiono solo dopo il ciclo 25.

2 Al termine della corsa, compare il pulsante Next (Avanti). Prima di procedere, esaminare i risultati sulla schermata Sequencing (Sequenziamento).

  NOTA
  La schermata Sequencing (Sequenziamento) è visualizzabile finché si seleziona Next (Avanti). Dopo aver selezionato Next (Avanti), non è possibile ritornare alla schermata Sequencing (Sequenziamento).

3 Selezionare **Next** (Avanti) per uscire dalla schermata Sequencing (Sequenziamento) e procedere con un lavaggio post-corsa.

  Per monitorare con maggiore dettaglio la corsa, utilizzare il Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) installato su un altro computer indipendente da quello dello strumento. Occorre una connessione alla rete.

  In alternativa, se siete connessi a BaseSpace, è possibile monitorare la corsa usando SAV in BaseSpace.

Generazione della griglia per l'identificazione dei cluster

La generazione della griglia per l'identificazione dei cluster è il processo mediante il quale le posizioni dei cluster sull'intera superficie della cella a flusso sono definite secondo le coordinate X e Y. L'analisi in tempo reale (RTA) usa i primi cicli della corsa per la generazione della griglia per l'identificazione dei cluster.

Dopo che la griglia delle posizioni dei cluster è stata generata, le immagini prodotte a ogni successivo ciclo di imaging vengono allineate rispetto alla griglia. Le intensità dei singoli cluster in tutti e quattro i canali cromatici dei nucleotidi possono essere estratte e le identificazioni delle basi possono essere ricavate dalle intensità dei cluster normalizzate.

Metriche della corsa

Le metriche della corsa appaiono sulla schermata Sequencing (Sequenziamento) in fasi differenti della corsa. Durante le fasi di generazione di cluster non appare alcuna metrica.

Dopo l'inizio del sequenziamento, in corrispondenza dei cicli indicati appaiono le seguenti metriche:

Metrica	Kit	Ciclo
Intensità	Kit di reagenti MiSeq v3	Ciclo 1-7
	Kit di reagenti MiSeq v2	Ciclo 1-4
	Kit di reagenti MiSeq v1	Ciclo 1-4
Intensità e densità cluster	Kit di reagenti MiSeq v3	Ciclo 8-25
	Kit di reagenti MiSeq v2	Ciclo 5-25
	Kit di reagenti MiSeq v1	Ciclo 5-25
Intensità, densità cluster, % PF, yield (resa) e Q-score (punteggio qualitativo)	Kit di reagenti MiSeq v3	Dal ciclo 26 al termine della corsa
	Kit di reagenti MiSeq v2	
	Kit di reagenti MiSeq v1	

Per maggiori informazioni sulle specifiche delle corse di MiSeq, visitare la pagina delle specifiche del sistema MiSeq sul sito Web Illumina (www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.ilmn).

Risultati dell'analisi primaria

L'output dell'analisi primaria di una corsa di sequenziamento è costituito da un gruppo di file di identificazione delle basi qualitativamente valutate (file *.bcl), che sono generati dai file immagine non elaborati.

La seguente tabella descrive le cartelle e i file generati dal software di analisi in tempo reale RTA (Real Time Analysis) durante l'analisi primaria. Molti di questi file vengono utilizzati per l'analisi secondaria dal software MiSeq Reporter.

File principale	Sotto-cartella	Descrizione
RTAComplete.txt	Cartella della corsa (livello base)	Un file di marker generato al termine dell'analisi di identificazione delle basi. La presenza di questo file innesca l'avvio dell'analisi secondaria.
SampleSheet.csv	Cartella della corsa (livello base)	Questo file viene letto e copiato nella cartella della corsa prima che la corsa abbia inizio e utilizzato in seguito per l'analisi secondaria.
RunInfo.xml	Cartella della corsa (livello base)	Identifica i limiti delle letture (comprese le letture indici) e la tabella qualità selezionata per la corsa.
File *.bcl	Data\Intensities\BaseCalls\L001*CX.X*	Ogni file *.bcl contiene i risultati dell'identificazione e della valutazione qualitativa delle basi eseguite dal software RTA per un ciclo e una tile.
File *.stats	Data\Intensities\BaseCalls\L001*CX.X*	I file *.stats contengono le statistiche di identificazione delle basi eseguita dal software RTA per un dato ciclo e una data tile.
File *.filter	Data\Intensities\BaseCalls	I file *.filter contengono i risultati di filtraggio per tile.
*.txt	Data\RTALogs	I file di registro dell'analisi primaria.
File *.cif	Data\Intensities\L001*CX.X*	Ogni file *.cif binario contiene i risultati dell'analisi delle immagini eseguita dal software RTA per un ciclo e una tile. Per maggiori informazioni, vedere *Numerazione delle "tile" (aree di imaging) della cella a flusso* a pagina 60.
File *.locs	Data\Intensities\BaseCalls\L001	Riporta le coordinate dei cluster. Ciascun file *.locs rappresenta una tile.
File *.jpg	Thumbnail_Images\L001*CX.X*	Immagini in miniatura generate per ogni ciclo e base, utilizzabili per diagnosticare i problemi di una corsa. Questi file non sono necessari per l'analisi secondaria e non sono copiati nella cartella Analysis.

Numerazione delle "tile" (aree di imaging) della cella a flusso

Quando, durante la corsa di sequenziamento, le tile sono sottoposte a imaging, per ciascuna tile viene generato un file di output al quale è assegnato un nome con il numero della tile in un formato a quattro cifre.

La cella a flusso standard v3 è sottoposta a imaging in 19 tile sulla superficie superiore e su quella inferiore, con risultati secondo il seguente formato di numerazione delle tile:

- I file di imaging denominati 1101 fino 1119 sono le tile 1-19 sulla superficie superiore.
- I file di imaging denominati 2101 fino 2119 sono le tile 1-19 sulla superficie inferiore.

La cella a flusso standard v2 è sottoposta a imaging in 14 tile sulla superficie superiore e su quella inferiore, con risultati secondo il seguente formato di numerazione delle tile:

- I file di imaging denominati 1101 fino 1114 sono le tile 1-14 sulla superficie superiore.
- I file di imaging denominati 2101 fino 2114 sono le tile 1-14 sulla superficie inferiore.

Il formato numerico delle tile è lo stesso utilizzato con le celle a flusso micro:

- I file di imaging denominati 1101 fino 1104 sono le tile 1-4 sulla superficie superiore.
- I file di imaging denominati 2101 fino 2104 sono le tile 1-4 sulla superficie inferiore.

Per le celle a flusso nano, i file di imaging sono denominati, per le tile uno e due sulla superficie superiore, 1101 e 1102.

I file di output per ciascuna tile vengono posti nella cartella della corsa in Data\Intensities\BaseCalls\L001.

Capitolo 3

Procedure di manutenzione

Introduzione 62
Lavaggi dello strumento 65
Esecuzione di un lavaggio post-corsa 67
Esecuzione di un lavaggio di manutenzione 73
Esecuzione di un lavaggio per lo standby 77
Aggiornamenti software 80
Spegnimento dello strumento 81

Introduzione

Eseguire sistematicamente un lavaggio dello strumento al termine di una corsa di sequenziamento.

I lavaggi eseguiti regolarmente assicurano la continuità della resa prestazionale dello strumento per i seguenti motivi:

- Eliminano gli eventuali residui di reagenti dalle linee della fluidica e dai pescanti
- Impediscono l'accumulo e la cristallizzazione dei sali nelle linee della fluidica e nei pescanti
- Impediscono la contaminazione incrociata con la corsa precedente

NOTA
Se si esegue un flusso di lavoro VeriSeq, attenersi alle linee guida specifiche per la frequenza di manutenzione per VeriSeq. Vedere *Frequenza di manutenzione per il flusso di lavoro VeriSeq* a pagina 63.

Frequenza di manutenzione

Eseguire le procedure di manutenzione seguenti agli intervalli raccomandati.

Tabella 1 Manutenzione durante il funzionamento normale

Attività	Frequenza
Lavaggio post-corsa	Dopo ogni corsa
Lavaggio di manutenzione	Mensilmente
Lavaggio per lo standby	Di preparazione alla modalità inattiva (se non usato per ≥ 7 giorni)
Spegnimento dello strumento	Come necessario

Tabella 2 Manutenzione durante la modalità inattiva (non usato per ≥7 giorni)

Attività	Frequenza
Lavaggio per lo standby	Mensilmente
Spegnimento dello strumento	Come necessario

Frequenza di manutenzione per il flusso di lavoro VeriSeq

Se si esegue il flusso di lavoro VeriSeq, eseguire le procedure di manutenzione seguenti agli intervalli raccomandati.

Tabella 3 Manutenzione durante il funzionamento normale

Attività	Frequenza
Lavaggio post-corsa	Dopo ogni corsa
Lavaggio di manutenzione	Mensilmente
Lavaggio post-corsa dalla schermata Perform Wash (Esecuzione lavaggio)	Dopo che è stato messo in modalità inattiva (se non usato per > 3 giorni)
Lavaggio per lo standby	Di preparazione alla modalità inattiva (se non usato per ≥ 7 giorni)
Spegnimento dello strumento	Come necessario

Tabella 4 Manutenzione durante la modalità inattiva (non usato per ≥7 giorni)

Attività	Frequenza
Lavaggio per lo standby	Mensilmente
Spegnimento dello strumento	Come necessario

NOTA

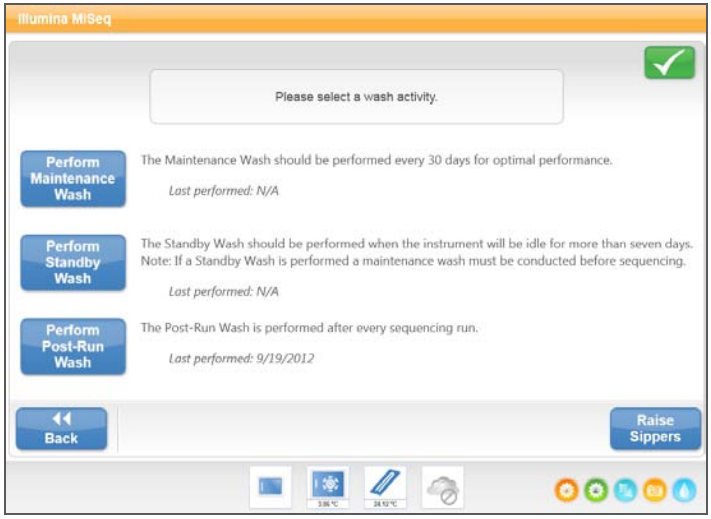
Per il flusso di lavoro VeriSeq, assicurarsi di eseguire i lavaggi post-corsa che includano un lavaggio della linea del templato. Vedere *Procedura con il lavaggio della linea del templato* a pagina 69.

Lavaggi dello strumento

Dalla schermata Perform Wash (Esecuzione lavaggio) si può dare inizio a tre tipi di lavaggio: lavaggio di manutenzione, lavaggio di standby e lavaggio post-corsa.

- **Maintenance Wash** (Lavaggio di manutenzione): consiste in tre cicli consecutivi di lavaggio che puliscono a fondo il sistema. Eseguire un lavaggio di manutenzione come minimo ogni 30 giorni. Vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione* a pagina 73.
  È possibile configurare lo strumento affinché esegua un lavaggio di manutenzione tra le corse. Per maggiori informazioni, vedere *Schermata Run Option (Opzioni corsa)* a pagina 22.
- **Standby Wash** (Lavaggio di standby): prepara adeguatamente i tubi della fluidica per il passaggio a un stato di inattività e consiste di due cicli consecutivi di lavaggio. Eseguire un lavaggio di standby se lo strumento sarà inattivo per un periodo fino a sette giorni. Vedere *Esecuzione di un lavaggio per lo standby* a pagina 77. Quando lo strumento è messo nello stato inattivo, è richiesto un lavaggio di manutenzione prima di impostare una nuova corsa di sequenziamento.
  Per i clienti che eseguono il flusso di lavoro VeriSeq, vedere *Frequenza di manutenzione per il flusso di lavoro VeriSeq* a pagina 63 per istruzioni su quando eseguire un lavaggio di standby.
- **Post-Run Wash** (Lavaggio post-corsa): il lavaggio post-corsa è il lavaggio standard dello strumento eseguito tra le corse di sequenziamento. Per eseguire un lavaggio post-corsa in un momento che non sia subito dopo una corsa, utilizzare il comando sulla schermata Perform Wash (Esecuzione lavaggio) per avviare il lavaggio.

Figura 23 Schermata Perform Wash (Esecuzione lavaggio)


Illumina MiSeq
Please select a wash activity.
Perform Maintenance Wash
The Maintenance Wash should be performed every 30 days for optimal performance.
Last performed: N/A
Perform Standby Wash
The Standby Wash should be performed when the instrument will be idle for more than seven days.
Note: If a Standby Wash is performed a maintenance wash must be conducted before sequencing.
Last performed: N/A
Perform Post-Run Wash
The Post-Run Wash is performed after every sequencing run.
Last performed: 9/19/2012
Back
Raise Sippers

Selezionare **Raise Sippers** (Solleva pescanti) per sollevare manualmente i pescanti della cartuccia di reagenti per rimuovere la cartuccia dallo strumento. Usare questo comando se la corsa è stata interrotta inaspettatamente o se si è verificato un errore durante la corsa. In queste circostanze, i pescanti non si sollevano automaticamente.

Esecuzione di un lavaggio post-corsa

Eseguire sistematicamente un lavaggio post-corsa dello strumento dopo l'ultimazione di una corsa di sequenziamento. Seguire le istruzioni del software per caricare i componenti di lavaggio ed eseguire il lavaggio. Il lavaggio post-corsa dura circa 20 minuti.

Illumina consiglia di eseguire il lavaggio subito dopo il completamento di una corsa. Un lavaggio dello strumento è richiesto prima di impostare una corsa successiva.

NOTA
Lasciare la cella a flusso usata nello strumento. Per eseguire un lavaggio dello strumento, è necessario che una cella a flusso sia caricata sullo strumento.

I clienti che eseguono MCS v2.5 o versione superiore possono scegliere un lavaggio post-corsa che includa un lavaggio della linea del templato. L'opzione di lavaggio della linea del templato viene selezionata sulla schermata Post-Run wash (Lavaggio post-corsa). Questa opzione di lavaggio post-corsa è raccomandata per i clienti che eseguono un flusso di lavoro VeriSeq o altre applicazioni altamente sensibili, come l'identificazione delle varianti somatiche.

Il lavaggio post-corsa che include un lavaggio della linea del templato richiede ipoclorito di sodio e una provetta MiSeq (n. codice MS-102-9999). Il lavaggio impiega circa 30 minuti. Vedere *Procedura con il lavaggio della linea del templato* a pagina 69.

NOTA
Non usare ipoclorito di sodio con un lavaggio di manutenzione o un lavaggio di standby.

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Tween 20 (Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949)
- Acqua da laboratorio
- Ipoclorito di sodio (da usare con un lavaggio post-corsa che includa un lavaggio della linea del templato)

Procedure

1 Preparare una soluzione di lavaggio fresca con Tween 20 e acqua da laboratorio nel modo seguente:

a Aggiungere 5 ml di Tween 20 100% a 45 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà Tween 20 10%.
b Aggiungere 25 ml di Tween 20 10% a 475 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio Tween 20 0,5%.
c Capovolgere cinque volte per miscelare.

2 Preparare i componenti di lavaggio con soluzione di lavaggio fresca come segue:
a Aggiungere 6 ml di soluzione di lavaggio a ciascun serbatoio del vassoio di lavaggio.
b Aggiungere 350 ml di soluzione di lavaggio al flacone di lavaggio da 500 ml.

3 Al termine della corsa, selezionare **Start Wash** (Avvia lavaggio). Il software alza automaticamente i pescanti nel vano refrigerato per i reagenti.

4 ***Non*** selezionare **Perform optional template line wash** (Esegui un lavaggio della linea del templato opzionale) sulla schermata Post-Run wash (Lavaggio post-corsa). Il lavaggio della linea del templato richiede una procedura diversa. Vedere *Procedura con il lavaggio della linea del templato* a pagina 69.

5 Aprire lo sportello dello scomparto reagenti e lo sportello del vano refrigerato per i reagenti e far scorrere la cartuccia di reagenti usata dal vano refrigerato.

6 Far scorrere il vassoio di lavaggio all'interno del vano refrigerato per i reagenti finché non si arresta poi chiudere lo sportello del vano refrigerato.

7 Sollevare la maniglia del pettine di aspirazione di fronte ai flaconi di PR2 e degli scarti finché non si blocca in sede.

8 Rimuovere il flacone di PR2 e sostituirlo con un flacone di lavaggio.

NOTA
Dopo ciascuna corsa smaltire il flacone di PR2. Non riutilizzare alcun PR2 residuo.

9 Rimuovere il flacone degli scarti ed eliminarne il contenuto seguendo le opportune procedure di smaltimento. Riposizionare il flacone degli scarti nello scomparto reagenti.

AVVERTENZA
Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati in conformità alle norme locali di sicurezza vigenti. Per maggiori informazioni, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

10 Abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione, accertandosi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di lavaggio e degli scarti.

11 Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

12 Selezionare **Next** (Avanti). Il lavaggio post-corsa ha inizio.

Dopo il completamento del lavaggio, lasciare sullo strumento la cella a flusso usata, il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio contenente la soluzione di lavaggio residua.

NOTA
I pescanti rimangono nella posizione abbassata, il che è normale. Lasciare la soluzione di lavaggio non utilizzata nel vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio per evitare che i pescanti si asciughino e che entri aria nel sistema.

Procedura con il lavaggio della linea del templato

NOTA
Per eseguire questa procedura di lavaggio post corsa è richiesto MCS v2.5, o versione successiva, che comprendere un lavaggio della linea del templato. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio post-corsa* a pagina 67.

1 Preparare una soluzione di lavaggio fresca con Tween 20 e acqua da laboratorio nel modo seguente:
   a Aggiungere 5 ml di Tween 20 100% a 45 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà Tween 20 10%.
   b Aggiungere 25 ml di Tween 20 10% a 475 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio Tween 20 0,5%.
   c Capovolgere cinque volte per miscelare.

2 Preparare una soluzione di lavaggio con ipoclorito di sodio fresca e con acqua da laboratorio nel modo seguente:
   a Aggiungere 30 µl di iploclorito di sodio al 6% a 870 µl di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una diluizione di ipoclorito di sodio di 1:30.
   b Aggiungere 50 µl di diluizione di ipoclorito di sodio di 1:30 a 950 µl di acqua da laboratorio in una provetta MiSeq fornita da Illumina (n. codice MS-102-9999).

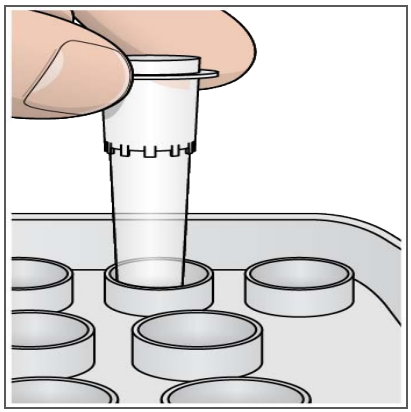
NOTA
È importante utilizzare una corretta concentrazione di ipoclorito di sodio. Assicurarsi di controllare la percentuale di ipoclorito di sodio sull'etichetta del prodotto. Se la concentrazione è troppo alta, potrebbe impedire la generazione di cluster nelle corse successive. Se non è disponibile ipoclorito di sodio al 6%, preparare una soluzione di 1 ml di ipoclorito di sodio allo 0,01% in acqua da laboratorio.

NOTA
Non usare ipoclorito di sodio con un lavaggio di manutenzione o un lavaggio di standby.

3 Preparare i componenti di lavaggio con soluzione di lavaggio fresca come segue:
   a Aggiungere 6 ml di soluzione di lavaggio a ciascun serbatoio del vassoio di lavaggio.
   b Aggiungere 350 ml di soluzione di lavaggio al flacone di lavaggio da 500 ml.

4 Inserire la provetta MiSeq contenente la soluzione di lavaggio di ipoclorito di sodio allo 0,01% nella posizione 17 del vassoio di lavaggio fino a quando il collo della provetta viene lavato con il vassoio. La provetta sposta la soluzione di Tween 20 e acqua da laboratorio nella posizione 17.

Figura 24 Provetta MiSeq nella posizione 17 del vassoio di lavaggio



NOTA
Assicurarsi di inserire la provetta MiSeq contenente ipoclorito di sodio solo nella posizione 17 del vassoio. Se la provetta viene inserita in una posizione diversa potrebbe impedire la generazione di cluster nelle corse successive e danneggiare il sistema di fluidica dello strumento MiSeq.

5 Al termine della corsa, selezionare **Start Wash** (Avvia lavaggio). Il software alza automaticamente i pescanti nel vano refrigerato per i reagenti.

6 Selezionare **Perform optional template line wash** (Eseguire un lavaggio della linea del templato opzionale) sulla schermata Post-Run Wash (Lavaggio post-corsa).

NOTA

Per i clienti che eseguono il flusso di lavoro VeriSeq: l'opzione **Perform optional template line wash** (Esegui un lavaggio della linea del templato opzionale) è pre-selezionata. MCS monitora il tipo di lavaggio post-corsa eseguito dopo ciascuna corsa. Se **Perform optional template line wash** (Esegui un lavaggio della linea del templato opzionale) non è selezionato per il lavaggio post-corsa, un messaggio sulla schermata Run Review (Revisione corsa) lo ricorda all'utente all'avvio della successiva corsa di sequenziamento.

7 Aprire lo sportello dello scomparto reagenti e lo sportello del vano refrigerato per i reagenti e far scorrere la cartuccia di reagenti usata dal vano refrigerato.

8 Far scorrere il vassoio di lavaggio all'interno del vano refrigerato per i reagenti finché non si arresta poi chiudere lo sportello del vano refrigerato.

9 Sollevare la maniglia del pettine di aspirazione di fronte ai flaconi di PR2 e degli scarti finché non si blocca in sede.

10 Rimuovere il flacone di PR2 e sostituirlo con un flacone di lavaggio.

NOTA

Dopo ciascuna corsa smaltire il flacone di PR2. Non riutilizzare alcun PR2 residuo.

11 Rimuovere il flacone degli scarti ed eliminarne il contenuto seguendo le opportune procedure di smaltimento. Riposizionare il flacone degli scarti nello scomparto reagenti.

AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati in conformità alle norme locali di sicurezza vigenti. Per maggiori informazioni, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

12 Abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione, accertandosi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di lavaggio e degli scarti.

13 Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

14 Selezionare **Next** (Avanti). Il lavaggio post-corsa ha inizio.

Dopo il completamento del lavaggio, lasciare sullo strumento la cella a flusso usata, il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio contenente la soluzione di lavaggio residua.

NOTA

I pescanti rimangono nella posizione abbassata, il che è normale. Lasciare la soluzione di lavaggio non utilizzata nel vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio per evitare che i pescanti si asciughino e che entri aria nel sistema.

Esecuzione di un lavaggio di manutenzione

Eseguire un lavaggio di manutenzione ogni 30 giorni per garantire prestazioni ottimali. Questa manutenzione include una serie di tre fasi di lavaggio utilizzando una soluzione di acqua da laboratorio miscelata con Tween 20. Il lavaggio di manutenzione richiede circa 90 minuti.

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Tween 20 (Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949)
- Acqua da laboratorio

Procedura

1. Accertarsi che una cella a flusso usata sia caricata sullo strumento.
2. Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio).
3. Nella schermata Perform Wash (Esecuzione lavaggio), selezionare **Maintenance Wash** (Lavaggio di manutenzione). Il software alza automaticamente i pescanti nel vano refrigerato per i reagenti.

Esecuzione del primo lavaggio

1. Preparare una soluzione di lavaggio fresca con Tween 20 e acqua da laboratorio nel seguente modo:
   a. Aggiungere 5 ml di Tween 20 100% a 45 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà Tween 20 10%.
   b. Aggiungere 25 ml di Tween 20 10% a 475 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio Tween 20 0,5%.
   c. Capovolgere cinque volte per miscelare.
2. Preparare i componenti di lavaggio con soluzione di lavaggio fresca come segue:
   a. Aggiungere 6 ml di soluzione di lavaggio a ciascun serbatoio del vassoio di lavaggio.
   b. Aggiungere 350 ml di soluzione di lavaggio al flacone di lavaggio da 500 ml.
3. Caricare sullo strumento il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio:

a Aprire lo sportello dello scomparto reagenti e lo sportello del vano refrigerato per i reagenti e far scorrere la cartuccia di reagenti usata o il vassoio di lavaggio dal vano refrigerato.
b Far scorrere il vassoio di lavaggio all'interno del vano refrigerato finché non si arresta. Chiudere lo sportello del vano refrigerato.
c Sollevare la maniglia del pettine di aspirazione di fronte al flacone di PR2 e al flacone degli scarti finché non si blocca in sede e sostituire il flacone di PR2 con il flacone di lavaggio.

NOTA
Dopo ciascuna corsa smaltire il flacone di PR2. Non riutilizzare alcun PR2 residuo.

d Rimuovere il flacone degli scarti ed eliminarne il contenuto seguendo le opportune procedure di smaltimento. Riposizionare il flacone degli scarti nello scomparto reagenti.
e Abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione, accertandosi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di lavaggio e degli scarti.
f Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

4 Selezionare **Next** (Avanti). Il primo lavaggio ha inizio.

Esecuzione del secondo lavaggio

NOTA
Per ciascuna fase di lavaggio usare sempre una soluzione fresca d'acqua. Il riutilizzo di soluzione di lavaggio da un lavaggio precedente può riportare degli scarti nelle linee della fluidica.

1 Preparare una soluzione di lavaggio fresca con Tween 20 e acqua da laboratorio nel modo seguente:
a Aggiungere 5 ml di Tween 20 100% a 45 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà Tween 20 10%.
b Aggiungere 25 ml di Tween 20 10% a 475 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio Tween 20 0,5%.
c Capovolgere cinque volte per miscelare.

2 Al termine del primo lavaggio, rimuovere il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio e smaltire la soluzione di lavaggio rimanente.

3 Riempire di nuovo i componenti di lavaggio con soluzione di lavaggio fresca come segue:

a Aggiungere 6 ml di soluzione di lavaggio a ciascun serbatoio del vassoio di lavaggio.
b Aggiungere 350 ml di soluzione di lavaggio al flacone di lavaggio da 500 ml.

4 Caricare il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio nel modo seguente:
a Far scorrere il vassoio di lavaggio all'interno del vano refrigerato finché non si arresta. Chiudere lo sportello del vano refrigerato.
b Caricare il flacone di lavaggio e abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione, accertandosi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di lavaggio e degli scarti.
c Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

5 Selezionare **Next** (Avanti). Il secondo lavaggio ha inizio.

Esecuzione del lavaggio finale

1 Preparare una soluzione di lavaggio fresca con Tween 20 e acqua da laboratorio nel modo seguente:
a Aggiungere 5 ml di Tween 20 100% a 45 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà Tween 20 10%.
b Aggiungere 25 ml di Tween 20 10% a 475 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio Tween 20 0,5%.
c Capovolgere cinque volte per miscelare.

2 Al termine del secondo lavaggio, rimuovere il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio e smaltire la soluzione di lavaggio rimanente.

3 Riempire di nuovo i componenti di lavaggio con soluzione di lavaggio fresca come segue:
a Aggiungere 6 ml di soluzione di lavaggio a ciascun serbatoio del vassoio di lavaggio.
b Aggiungere 350 ml di soluzione di lavaggio al flacone di lavaggio da 500 ml.

4 Caricare il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio nel modo seguente:
a Far scorrere il vassoio di lavaggio all'interno del vano refrigerato finché non si arresta. Chiudere lo sportello del vano refrigerato.
b Caricare il flacone di lavaggio e abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione, accertandosi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di lavaggio e degli scarti.
c Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

5 Selezionare **Next** (Avanti). Il lavaggio finale ha inizio.

Dopo il lavaggio

Dopo il completamento del lavaggio, lasciare sullo strumento la cella a flusso usata, il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio contenente la soluzione di lavaggio residua.

NOTA

I pescanti rimangono nella posizione abbassata, il che è normale. Lasciare la soluzione di lavaggio non utilizzata nel vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio per evitare che i pescanti si asciughino e che entri aria nel sistema.

Esecuzione di un lavaggio per lo standby

Nel caso si preveda di non usare lo strumento nei sette giorni successivi, prepararlo per lo stato di inattività (idle) eseguendo un lavaggio di standby. Un lavaggio di standby esegue due lavaggi consecutivi, che puliscono ciascuna posizione liberandola da ogni reagente residuo o accumulo dei sali. Ciascun lavaggio dura circa 60 minuti. Per l'esecuzione del lavaggio di standby prevedere circa due ore.

Al termine del lavaggio di standby, lo strumento è in modalità standby e appare un messaggio sulla schermata Welcome (Benvenuto) che indica lo stato dello strumento. Quando lo strumento è in modalità standby, deve essere eseguito un lavaggio di manutenzione prima di poter avviare una corsa di sequenziamento.

NOTA
Illumina consiglia di ripetere il lavaggio di standby ***ogni 30 giorni*** di permanenza nello stato inattivo. Se si esegue il flusso di lavoro VeriSeq, vedere *Frequenza di manutenzione per il flusso di lavoro VeriSeq* a pagina 63.

Materiali di consumo forniti dall'utente

- Tween 20 (Sigma-Aldrich, n. di catalogo P7949)
- Acqua da laboratorio

Procedura

1. Accertarsi che una cella a flusso usata sia caricata sullo strumento.
2. Dalla schermata Welcome (Benvenuto), selezionare **Perform Wash** (Esecuzione lavaggio).
3. Nella schermata Wash Options (Opzioni lavaggio), selezionare **Standby Wash** (Lavaggio di standby). Il software alza automaticamente i pescanti nel vano refrigerato per i reagenti.

Esecuzione del primo lavaggio

1. Preparare una soluzione di lavaggio fresca con Tween 20 e acqua da laboratorio nel seguente modo:

a Aggiungere 5 ml di Tween 20 100% a 45 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà Tween 20 10%.
b Aggiungere 25 ml di Tween 20 10% a 475 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio Tween 20 0,5%.
c Capovolgere cinque volte per miscelare.

2 Preparare i componenti di lavaggio con soluzione di lavaggio fresca come segue:
a Aggiungere 6 ml di soluzione di lavaggio a ciascun serbatoio del vassoio di lavaggio.
b Aggiungere 350 ml di soluzione di lavaggio al flacone di lavaggio da 500 ml.

3 Caricare sullo strumento il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio:
a Aprire lo sportello dello scomparto reagenti e lo sportello del vano refrigerato per i reagenti e far scorrere la cartuccia di reagenti usata o il vassoio di lavaggio dal vano refrigerato.
b Far scorrere il vassoio di lavaggio all'interno del vano refrigerato finché non si arresta. Chiudere lo sportello del vano refrigerato.
c Sollevare la maniglia del pettine di aspirazione di fronte al flacone di PR2 e al flacone degli scarti finché non si blocca in sede e sostituire il flacone di PR2 con il flacone di lavaggio.

NOTA
Dopo ciascuna corsa smaltire il flacone di PR2. Non riutilizzare alcun PR2 residuo.

d Rimuovere il flacone degli scarti ed eliminarne il contenuto seguendo le opportune procedure di smaltimento. Riposizionare il flacone degli scarti nello scomparto reagenti.
e Abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione, accertandosi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di lavaggio e degli scarti.
f Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.

4 Selezionare **Next** (Avanti). Il primo lavaggio ha inizio.

Esecuzione del secondo lavaggio

NOTA
Per ciascuna fase di lavaggio usare sempre una soluzione fresca d'acqua. Il riutilizzo di soluzione di lavaggio da un lavaggio precedente può riportare degli scarti nelle linee della fluidica.

1. Preparare una soluzione di lavaggio fresca con Tween 20 e acqua da laboratorio nel modo seguente:
   a. Aggiungere 5 ml di Tween 20 100% a 45 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà Tween 20 10%.
   b. Aggiungere 25 ml di Tween 20 10% a 475 ml di acqua da laboratorio. Con questi volumi si otterrà una soluzione di lavaggio Tween 20 0,5%.
   c. Capovolgere cinque volte per miscelare.
2. Al termine del primo lavaggio, rimuovere il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio e smaltire la soluzione di lavaggio rimanente.
3. Riempire di nuovo i componenti di lavaggio con soluzione di lavaggio fresca come segue:
   a. Aggiungere 6 ml di soluzione di lavaggio a ciascun serbatoio del vassoio di lavaggio.
   b. Aggiungere 350 ml di soluzione di lavaggio al flacone di lavaggio da 500 ml.
4. Caricare il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio nel modo seguente:
   a. Far scorrere il vassoio di lavaggio all'interno del vano refrigerato finché non si arresta. Chiudere lo sportello del vano refrigerato.
   b. Caricare il flacone di lavaggio e abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione, accertandosi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di lavaggio e degli scarti.
   c. Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.
5. Selezionare **Next** (Avanti). Il secondo lavaggio ha inizio.

Dopo il lavaggio

Dopo il completamento del lavaggio, lasciare sullo strumento la cella a flusso usata, il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio contenente la soluzione di lavaggio residua.

NOTA

I pescanti rimangono nella posizione abbassata, il che è normale. Lasciare la soluzione di lavaggio non utilizzata nel vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio per evitare che i pescanti si asciughino e che entri aria nel sistema.

Aggiornamenti software

Se il sistema è collegato a una rete con accesso a Internet, si può aggiornare il software dello strumento dalla schermata Welcome (Benvenuto).

Non appena sono disponibili aggiornamenti software, appare sulla schermata Welcome (Benvenuto) il pulsante **Update Available** (Aggiornamento disponibile). Altrimenti quel pulsante non è visibile.

Per avviare un aggiornamento software, selezionare **Update Available** (Aggiornamento disponibile). Viene visualizzata una finestra di dialogo per confermare il comando. Dopo la conferma, è necessario riavviare lo strumento. L'installazione dell'aggiornamento inizia automaticamente dopo il riavvio.

Se lo strumento non è collegato a una rete con accesso a Internet, si può aggiornare il software manualmente.

Schermata Manual Update (Aggiornamento manuale)

La funzione Manual Update (Aggiornamento manuale) permette di aggiornare il software di controllo e il software di analisi dello strumento dall'interfaccia del sistema MiSeq mediante navigazione alla posizione del file del software installabile.

Selezionare **Browse** (Sfoglia) per aprire il percorso dove risiede il file installabile della nuova versione del software. Quando appare sullo schermo il percorso del file installabile, selezionare **Update** (Aggiorna).

Se lo strumento è connesso a una rete, si può aggiornare il software automaticamente. Per maggiori informazioni, vedere *Aggiornamenti software* a pagina 80.

Spegnimento dello strumento

Di norma, si consiglia di lasciare lo strumento sempre acceso. Tuttavia, nel caso sia necessario spegnere lo strumento, attenersi alla procedura seguente per spegnere Windows e preparare i tubi della fluidica.

1. Eseguire un lavaggio di manutenzione. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione* a pagina 73.
2. Rimuovere il flacone degli scarti ed eliminarne il contenuto seguendo le opportune procedure di smaltimento. Riposizionare il flacone degli scarti nello scomparto reagenti.
3. Chiudere lo sportello dello scomparto reagenti.
4. Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **Shut Down** (Spegnimento). Questo comando spegne il software.
5. Portare l'interruttore di alimentazione nella posizione OFF.

NOTA

Ogni volta che si spegne lo strumento, attendere ***almeno*** 60 secondi prima di riaccenderlo portando l'interruttore di alimentazione su ON.

Capitolo 4

Risoluzione dei problemi

Introduzione 84
Bundle Logs (Raggruppa log) per la risoluzione dei problemi 85
Impostazioni del software 87
Sospensione o arresto di una corsa 92
Risoluzione degli errori d'impostazione corsa 95
Risoluzione degli errori di lettura dell'etichetta RFID 97
Risoluzione errore portata 99
Esecuzione di un test volume 100
Misurazione dei volumi di lavaggio attesi 104

Introduzione

Questa sezione descrive comuni passi per la risoluzione dei problemi da seguire prima di rivolgersi all'Assistenza tecnica Illumina. Per la maggior parte dei problemi, appare un messaggio sullo schermo con istruzioni per la risoluzione.

Per eventuali domande tecniche, visitare le pagine di supporto relative al sistema MiSeq sul sito Web Illumina per accedere alle domande frequenti, oppure eseguire il log in sul proprio account MyIllumina per prendere visione dei bollettini di assistenza.

Per problemi relativi alla qualità della corsa o alle prestazioni, rivolgersi all'Assistenza tecnica Illumina. Per maggiori informazioni, vedere *Assistenza tecnica* a pagina 109.

L'addetto dell'Assistenza tecnica Illumina di solito richiede copie dei file specifici per la corsa, per risolvere il problema. È possibile usare la scheda Bundle Logs (Raggruppa log) sulla schermata Manage Files (Gestione file) per raggruppare e comprimere in formato zip i file richiesti per la risoluzione dei problemi. Vedere *Bundle Logs (Raggruppa log) per la risoluzione dei problemi* a pagina 85.

Bundle Logs (Raggruppa log) per la risoluzione dei problemi

Bundle Logs (Raggruppa log) è una funzione che aiuta a raggruppare e comprimere in formato zip i file da inviare all'Assistenza tecnica Illumina per la risoluzione dei problemi.

Tabella Bundle Logs (Raggruppa log)

Usare la scheda Bundle Logs (Raggruppa log) sulla schermata Manage Files (Gestione file) per selezionare un gruppo di file, chiamato *raggruppamento*. Il raggruppamento viene automaticamente compresso in formato zip.

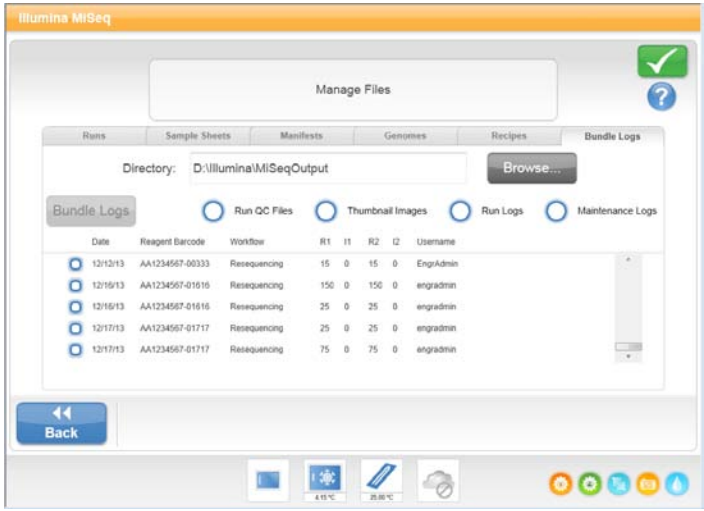
NOTA
La funzione Bundle Logs (Raggruppa log) raggruppa i file di una corsa in un tipo di gruppo alla volta. Ripetere la procedura di raggruppamento dei log per ciascuna corsa o tipo di raggruppamento richiesto dall'Assistenza tecnica Illumina.

1. Sulla schermata Manage Files (Gestione file), selezionare la scheda **Bundle Logs** (Raggruppa log).
2. Selezionare **Browse** (Sfoglia) per andare alla cartella MiSeqOutput.
3. Fare clic nella casella blu accanto alla corsa e nel cerchio blu accanto al tipo di raggruppamento richiesto dall'Assistenza tecnica Illumina.
4. Selezionare **Bundle Logs** (Raggruppa log).
5. Viene visualizzata una schermata Bundle Files (File da raggruppare) con le informazioni relative al raggruppamento, incluso un elenco di singoli file contenuti nel raggruppamento.
   Per maggiori informazioni sui singoli file e cartelle della funzione Bundle Logs (Raggruppa log), vedere *Scheda di riferimento rapida per le cartelle di output e di analisi di MiSeq (n. codice 15034791)*.
6. Selezionare **Next** (Avanti).
7. Andare alla posizione in cui si desidera salvare i file raggruppati compressi in formato zip.
8. Fare clic su **Save** (Salva).
9. Viene visualizzato un messaggio Bundling Files (Raggruppamento file in corso).

10 Quando i file sono stati raggruppati, si apre nuovamente la scheda Bundle Logs (Raggruppa log).

11 Inviare questo file compresso in formato zip all'Assistenza tecnica Illumina.

Figura 25 Tabella Bundle Logs (Raggruppa log)



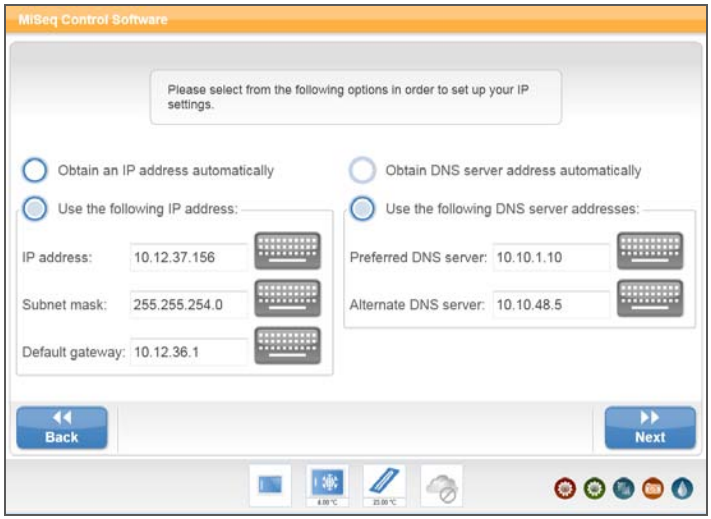
Impostazioni del software

Il software MCS comprende diverse schermate per accedere ai comandi che permettono di configurare il sistema e di gestire lo strumento.

Schermata System Settings (Impostazioni di sistema)

Le impostazioni di sistema vengono normalmente configurate all'installazione iniziale quando lo strumento è avviato per la prima volta. Se è necessario modificare le impostazioni a causa di una modifica alla rete o al laboratorio, usare la funzione System Settings (Impostazioni di sistema).

Figura 26 System Settings (Impostazioni di sistema)


MiSeq Control Software
Please select from the following options in order to set up your IP settings.
Obtain an IP address automatically
Use the following IP address:
IP address: 10.12.37.156
Subnet mask: 255.255.254.0
Default gateway: 10.12.36.1
Obtain DNS server address automatically
Use the following DNS server addresses:
Preferred DNS server: 10.10.1.10
Alternate DNS server: 10.10.48.5
Back
Next

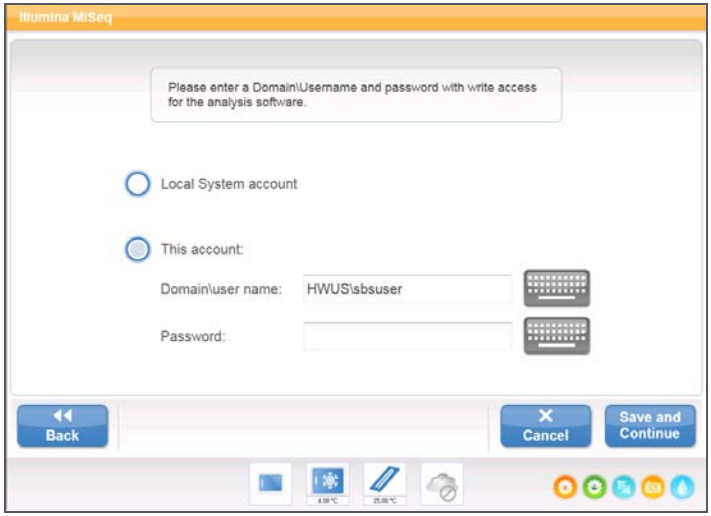
Rivolgersi all'amministratore della struttura per informazioni relative alle impostazioni di rete da inserire.

Modifica credenziali di sistema

Modificare il nome utente e la password del sistema sulla schermata System Settings (Impostazioni di sistema). Selezionare **System Settings** (Impostazioni di sistema) sulla schermata Manage Instrument (Gestione strumento) e quindi selezionare **Save and Continue** (Salva e continua) per passare alla terza schermata della serie di tre.

Selezionare **This account** (Questo account). Inserire il nome del dominio (ad esempio, Domain\MiSeq1) e la password. Selezionare **Save and Continue** (Salva e continua). Vengono aggiornate anche le credenziali per MiSeq Reporter e BaseSpace.

Figura 27 System Settings (Impostazioni di sistema)



Schermata System Check (Verifica sistema)

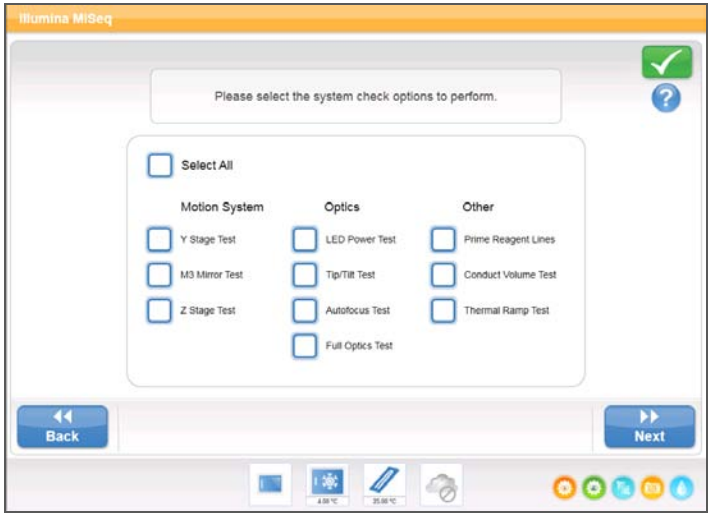
La funzione System Check (Verifica sistema) di norma è utilizzata per collegarsi ad un addetto dell'Assistenza tecnica Illumina durante una sessione Live Help (Assistenza in diretta). L'uso di questa funzione non è necessario durante il normale funzionamento o per la manutenzione dello strumento.

Alcuni controlli di sistema possono essere eseguiti prima di rivolgersi all'Assistenza tecnica Illumina, ad esempio il Volume Test (Test volume). Il test volume verifica il corretto stato del sistema di fluidica stimando il volume del flusso al passaggio delle bolle tra i sensori. Per maggiori informazioni, vedere *Esecuzione di un test volume* a pagina 100.

Al termine di un System Check (Verifica sistema), i risultati del test appaiono sullo schermo:

- Selezionare **Show Details** (Mostra dettagli) per visualizzare un riepilogo dei risultati sull'interfaccia di MiSeq.
- Selezionare **Export Results** (Esporta risultati) per esportare i risultati in formato *.csv su un dispositivo USB.

Figura 28 Opzioni System Check (Verifica sistema)

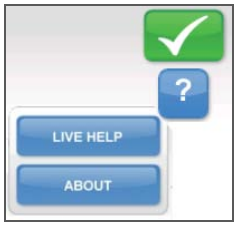


Funzione Live Help (Assistenza in diretta)

Per abilitare Live Help (Assistenza in diretta), il sistema MiSeq deve essere collegato a una rete con accesso a Internet. La funzione Live Help (Assistenza in diretta) è uno strumento di assistenza online che consente a un addetto dell'Assistenza tecnica Illumina di visualizzare la schermata di MiSeq, con il consenso dell'utente, e di condividere il controllo dello strumento. L'utente mantiene il controllo prioritario sullo strumento e può mettere fine alla sessione di condivisione della schermata in qualsiasi momento.

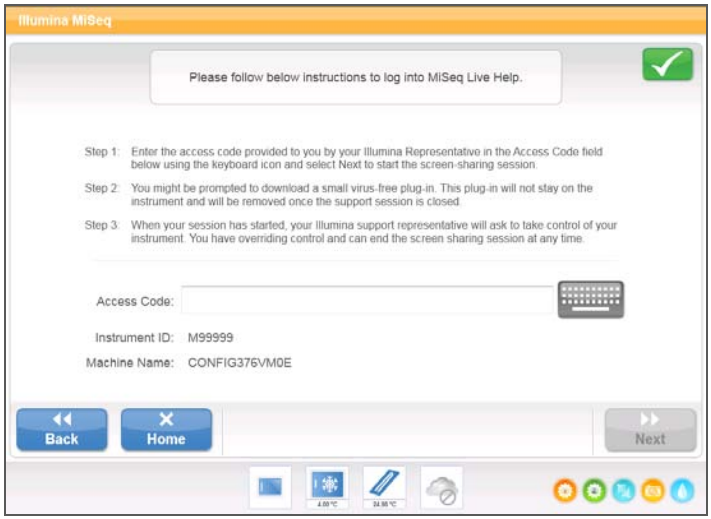
La funzione Live Help (Assistenza in diretta) è accessibile selezionando l'icona della guida sulla schermata di benvenuto.

Figura 29 Menu Help (Guida)



Per rendere possibile una connessione, prima si deve obbligatoriamente ottenere un codice di accesso univoco dal Supporto tecnico Illumina; poi inserire quel codice nella schermata Live Help (Assistenza in diretta) e infine selezionare **Next** (Avanti).

Figura 30 Schermata Live Help (Assistenza in diretta)


Illumina MiSeq
Please follow below instructions to log into MiSeq Live Help.
Step 1: Enter the access code provided to you by your Illumina Representative in the Access Code field below using the keyboard icon and select Next to start the screen-sharing session.
Step 2: You might be prompted to download a small virus-free plug-in. This plug-in will not stay on the instrument and will be removed once the support session is closed.
Step 3: When your session has started, your Illumina support representative will ask to take control of your instrument. You have overriding control and can end the screen sharing session at any time.
Access Code:
Instrument ID: M99999
Machine Name: CONFIG376VM0E
Back
Home
Next

Sospensione o arresto di una corsa

Il sistema MiSeq è progettato per eseguire una corsa dall'inizio alla fine senza intervento dell'utente. È tuttavia possibile sospendere o arrestare una corsa dalla schermata Sequencing (Sequenziamento).

Sospensione di una corsa

È possibile sospendere temporaneamente una corsa prima del suo completamento. È possibile sospendere una corsa se si sospetta, per esempio, che il flacone degli scarti sia pieno. È possibile riprendere una corsa sospesa.

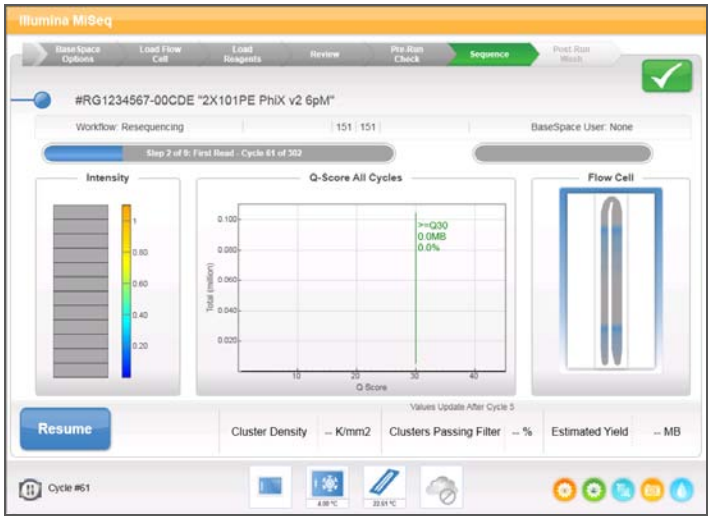
ATTENZIONE

Non sospendere una corsa durante la generazione di cluster o nei primi otto cicli di sequenziamento. Non è possibile riprendere una corsa che è stata sospesa in queste fasi. Consultare *Metriche della corsa* a pagina 58 per informazioni sui cicli per i kit della cartuccia di reagenti MiSeq.

Quando si seleziona **Pause** (Pausa), l'esecuzione del comando corrente viene portata a termine e la cella a flusso viene posta in uno stato di preservazione.

Per sospendere la corsa dalla schermata Sequencing (Sequenziamento), selezionare **Pause** (Pausa). Il pulsante cambia, diventando Resume (Ripresa). Quando si è pronti a riprendere la corsa, selezionare **Resume** (Ripresa).

Figura 31 Schermata Sequence (Sequenziamento) di una corsa sospesa

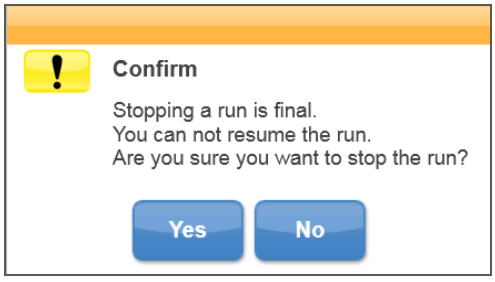


Arresto di una corsa

L'utente può arrestare una corsa durante il sequenziamento prima che la corsa sia giunta a termine usando il pulsante **Stop** (Arresta) sulla schermata Sequencing (Sequenziamento). È possibile arrestare una corsa in caso di errata impostazione, se la qualità dei dati è insoddisfacente o se si verifica un errore hardware.

Quando si arresta una corsa, l'esecuzione del comando corrente non viene portata a termine e il piano portacelle si sposta nella posizione di espulsione. L'analisi primaria continua per l'ultimo ciclo completato.

Figura 32 Arresto della corsa



L'arresto di una corsa è definitivo. Una corsa arrestata non può essere ripresa. Si può solo passare al lavaggio dello strumento.

Risoluzione degli errori d'impostazione corsa

Se durante la verifica pre-corsa uno qualsiasi dei controlli non è superato, appare un'icona rossa ✗ vicino all'elemento interessato. Sullo schermo viene visualizzato un messaggio che descrive l'errore e il modo per correggerlo.

Errore	Intervento
✗ **Flow Rate Measured (Portata misurata)**	Si apre la schermata della portata. Utilizzare l'elenco a discesa o la tastiera sullo schermo per inserire quanto segue: • Solution (Soluzione): **PR2** • Volume (Volume): **250** • Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **2500** • Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2500** Selezionare **Pump** (Pompa). Se l'errore permane, impostare il volume per pompare 500 µl di PR2 e ripetere il processo. Dopo l'erogazione dei fluidi, selezionare **Restart Check** (Riavvia verifica). Se la verifica pre-corsa viene eseguita correttamente, il pulsante **Start Run** (Avvia corsa) diventa attivo. Se di nuovo la verifica del flusso non viene superata, risistemare nella sua sede la cella a flusso per assicurare che il flusso non si interrompa a causa di una allineamento scorretto. Ispezionare la guarnizione della cella a flusso controllando che non ci siano particelle estranee o irregolarità.
✗ **Free Disk Space (Spazio libero su disco)**	Se lo spazio su disco è insufficiente, viene visualizzato un messaggio indicante lo spazio necessario. Usare la funzione **Manage Files** (Gestione file) per liberare lo spazio necessario sul computer dello strumento.
✗ **Network Connection Active (Connessione rete attiva)**	Verificare che il cavo di rete sia ben collegato allo strumento. Se la connessione alla rete non è ripristinata, selezionare **Reboot** (Riavvia) sulla schermata Manage Instrument (Gestione strumento) per riavviare il software. Se la connessione continua a non essere ripristinata, selezionare **Shut Down** (Spegnimento) sulla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), poi spegnere lo strumento utilizzando l'interruttore di alimentazione. Attendere almeno 60 secondi e poi accendere lo strumento e avviare il software.

Errore	Intervento
Primary Analysis Ready (Pronta l'analisi primaria)	L'analisi primaria della corsa precedente non è terminata. Il tempo preimpostato concesso per la conclusione dell'analisi primaria è un'ora e sullo schermo compare un conteggio alla rovescia. Le opzioni sono di attendere un'ora o di selezionare **Terminate Analysis** (Terminare analisi). L'analisi secondaria si interrompe per ciascun ciclo incompleto.
Sample Sheet Present (Presente foglio campioni)	Se non si è attribuito il nome al foglio campioni con l'ID della cartuccia di reagenti della corsa, lo strumento non è in grado di trovare automaticamente il foglio campioni appropriato. Navigare fino a raggiungere il foglio campioni della corsa. Se si è attribuito al foglio campioni un nome con l'ID della cartuccia di reagenti per la corsa, accertarsi che il foglio campioni sia collocato nella cartella foglio campioni predefinita. Controllare il percorso predefinito in Run Options (Opzioni corsa) della schermata Welcome (Benvenuto). Accertarsi che l'estensione file del foglio campioni sia *.csv. Se il foglio campioni risulta irreperibile, crearne uno nuovo e copiarlo nella cartella specificata in Run Options (Opzioni corsa). Dopo aver localizzato un foglio campioni, selezionare **Restart Check** (Riavvia verifica).

Risoluzione degli errori di lettura dell'etichetta RFID

Se il sistema non è in grado di leggere l'etichetta RFID di un materiale di consumo, è possibile ottenere un codice temporaneo di bypass dal sito Web Illumina. Il codice temporaneo di bypass scade dopo sette giorni.

1. Prima di procedere, selezionare sempre **Retry** (Riprova). Se l'errore di lettura dell'etichetta RFID si ripete, selezionare **Get Code** (Richiedi codice).
2. Da un computer con accesso a Internet, andare a my.illumina.com e accedere con il proprio account MyIllumina.
3. Da MyIllumina, fare clic su **Account** (Account). Nella colonna Resources (Risorse), fare clic su **MiSeq Self-Service** (Self-Service MiSeq).
4. Sulla pagina MiSeq Self-Service (Self-Service MiSeq), inserire il **MiSeq serial number** (Numero di serie MiSeq).
5. Dall'elenco a discesa Type of Override Code (Tipo di codice di sovrascrittura), selezionare **RFID Override** (Sovrascrivi RFID).

Figura 33 Pagina MiSeq Self-Service (Self-Service MiSeq)

6. Per generare il codice, selezionare **Get Code** (Ottieni codice).
7. Ritornare all'interfaccia MCS e selezionare **Enter Code** (Inserisci codice).

8 Utilizzando la tastiera sullo schermo, inserire il codice temporaneo di bypass e poi selezionare **Next** (Avanti).

9 Inserire il numero del codice a barre della cella a flusso, del flacone di PR2 o della cartuccia di reagenti.

Materiale di consumo	Posizione del numero del codice a barre
Cella a flusso	Sopra il codice a barre sull'etichetta del contenitore della cella a flusso. I numeri del codice a barre della cella a flusso iniziano con A (standard), G (micro) e D (nano). Esempio: A0E61
Flacone di PR2	Sotto il codice a barre sull'etichetta del flacone di PR2. Esempio: MS0011881-PR2
Cartuccia di reagenti	Sotto il codice a barre sull'etichetta della cartuccia di reagenti. Esempio: MS0010744-300

10 Se si sta inserendo un codice di bypass per la cartuccia di reagenti, inserire il numero della versione del kit. Selezionare **Enter Reagent Kit Barcode** (Inserisci codice a barre kit di reagenti) per l'inserimento manuale del numero del codice a barre della cartuccia di reagenti e il numero della versione del kit.

ATTENZIONE
L'inserimento di una versione errata del kit può incidere negativamente sui dati di sequenziamento.

11 Selezionare **Enter** (Invio).

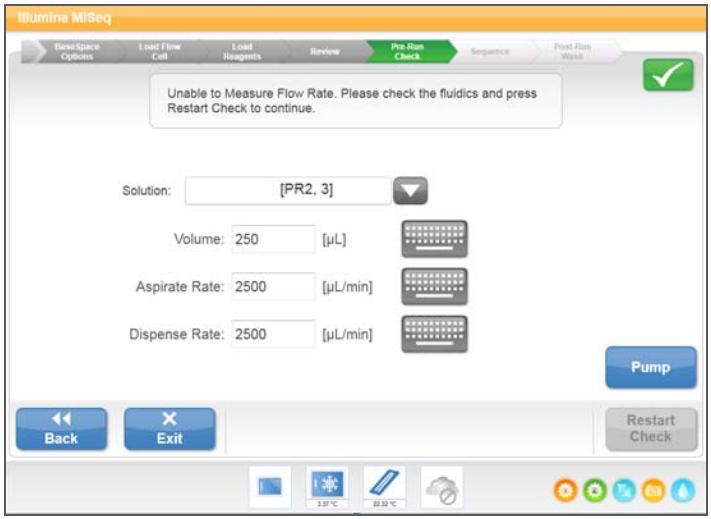
Risoluzione errore portata

La portata è la velocità con la quale i fluidi transitano nel sistema di fluidica (µl/min) ed è misurata prima di ciascuna corsa durante la verifica pre-corsa. Se il sistema non è in grado di misurare la portata, viene richiesto di pompare un volume di reagente (PR2) nel sistema prima di verificare di nuovo la portata.

1 Utilizzare l'elenco a discesa o la tastiera sullo schermo per inserire le seguenti informazioni:
- Solution (Soluzione): **PR2**
- Volume (Volume): **250 µl**
- Aspirate Rate (Velocità di aspirazione): **2500 µl/min**
- Dispense Rate (Velocità di erogazione): **2500 µl/min**

2 Selezionare **Pump** (Pompa).

Figura 34 Misurare la portata



3 Una volta terminata la fase di pompaggio, selezionare **Restart Check** (Riavvia verifica).

4 Se l'errore permane, impostare il volume per pompare 500 µl di PR2 e ripetere il processo ancora una volta. Se il secondo tentativo non risolve l'errore, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Esecuzione di un test volume

Un'ostruzione nelle linee della fluidica possono provocare scarsa erogazione dei reagenti e incidere sui risultati del sequenziamento. Nel caso si sospetti un'ostruzione nelle linee della fluidica, eseguire un test volume.

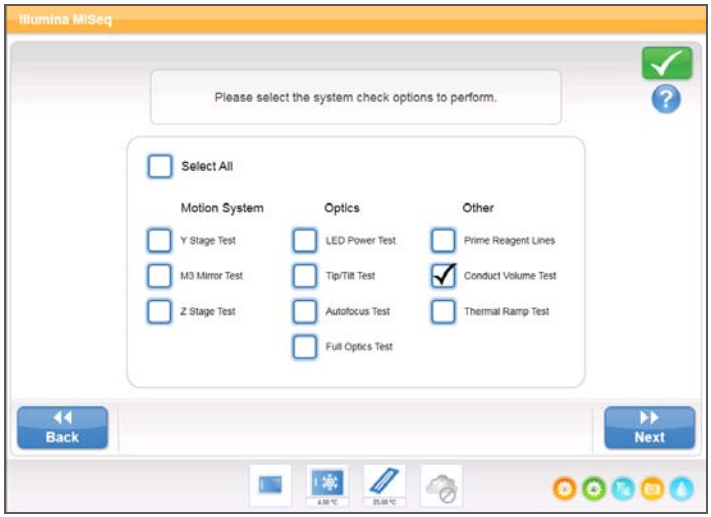
Il test volume verifica il corretto stato del sistema di fluidica stimando il volume tra due bolle al loro passaggio tra i sensori. Per eseguire un test volume, con una cella flusso usata presente sul dispositivo, caricare con acqua da laboratorio il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio. Per eseguire il test, seguire le istruzioni sullo schermo.

1 Accertarsi che una cella a flusso usata sia caricata sullo strumento.

2 Dalla schermata Manage Instrument (Gestione strumento), selezionare **System Check** (Verifica sistema).

3 Selezionare **Conduct Volume Test** (Esegui test volume) e poi selezionare **Next** (Avanti).

Figura 35 Schermata System Check (Verifica sistema)



4 Riempire ciascun serbatoio del vassoio di lavaggio con 6 ml di acqua da laboratorio.

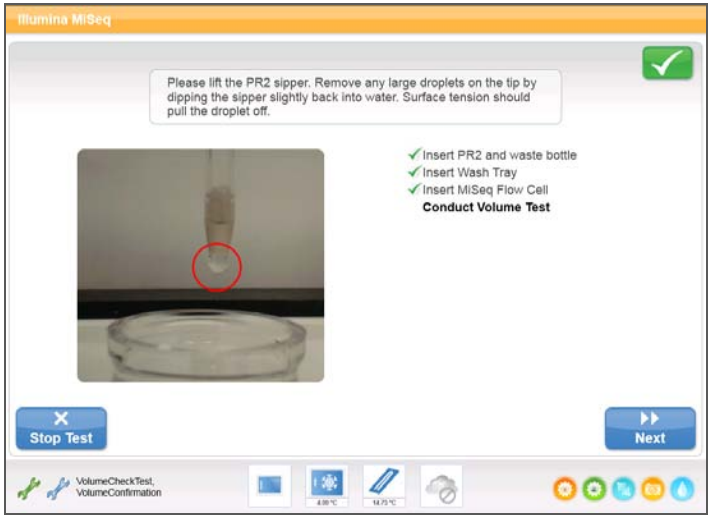
5 Riempire con 350 ml di acqua da laboratorio il flacone di lavaggio da 500 ml.

6 Caricare sullo strumento il vassoio di lavaggio e il flacone di lavaggio.

a Aprire lo sportello dello scomparto reagenti e lo sportello del vano refrigerato per i reagenti e fare scorrere il vassoio di lavaggio verso il vano refrigerato fino al punto di arresto. Chiudere lo sportello del vano refrigerato.
b Sollevare la maniglia del pettine di aspirazione finché non si blocca in sede e caricare il flacone di lavaggio.
c Rimuovere il flacone degli scarti ed eliminarne il contenuto seguendo le opportune procedure di smaltimento. Riposizionare il flacone degli scarti nello scomparto reagenti.
d Abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione, accertandosi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di lavaggio e degli scarti.

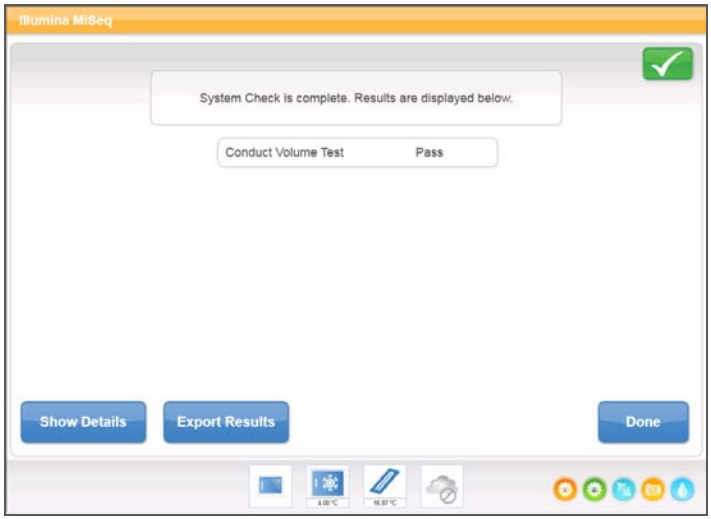
7 Seguendo le istruzioni sullo schermo, rimuovere le eventuali goccioline dal pescante del flacone di lavaggio, come segue:
a Quando compare la corrispondente istruzione, sollevare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione e verificare se sul pescante del flacone di lavaggio è presente una grossa gocciolina d'acqua.
b Quando compare la corrispondente istruzione, abbassare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione a sufficienza nell'acqua per consentire che la tensione superficiale rimuova la gocciolina.
c Quando compare la corrispondente istruzione, sollevare lentamente la maniglia del pettine di aspirazione e verificare se sul pescante del flacone di lavaggio è presente una grossa gocciolina d'acqua.
d Quando compare la corrispondente istruzione, abbassare lentamente in modo completo la maniglia del pettine di aspirazione, accertandosi che i pescanti vengano abbassati nei flaconi di lavaggio e degli scarti.

Figura 36 Rimozione di una gocciolina dal pescante


Illumina MiSeq
Please lift the PR2 sipper. Remove any large droplets on the tip by dipping the sipper slightly back into water. Surface tension should pull the droplet off.
Insert PR2 and waste bottle
Insert Wash Tray
Insert MiSeq Flow Cell
Conduct Volume Test
Stop Test
Next
VolumeCheckTest, VolumeConfirmation

8 Selezionare **Next** (Avanti). Ha inizio il test volume.
Una volta terminato il test volume, sullo schermo appaiono i risultati.

Figura 37 Risultati del test volume



Se il test non viene superato, eseguire un lavaggio di manutenzione. Vedere *Esecuzione di un lavaggio di manutenzione* a pagina 73.

9 Al termine del lavaggio di manutenzione, ripetere il test volume.

Misurazione dei volumi di lavaggio attesi

La misurazione dei volumi di lavaggio attesi conferma che la fluidica di lavaggio sta funzionando in modo efficiente.

1 Prima d'iniziare un lavaggio, svuotare il flacone degli scarti.

2 Al termine del lavaggio, misurare il volume di lavaggio nel flacone degli scarti.

Tipo di lavaggio	Volume di lavaggio atteso
Lavaggio post-corsa	17,25 ml
Lavaggio post-corsa che include un lavaggio della linea del templato	25,5 ml
Lavaggio per lo standby	46 ml
Lavaggio di manutenzione	17,25 ml

Indice

A

accensione dello strumento 13
aggiornamento software 80
analisi
  durante il sequenziamento 31
  opzioni 29
analisi in tempo reale
  generazione griglia identificazione cluster 58
Analisi in tempo reale (RTA) 2
  cartella della corsa 32
  risultati 59
analisi secondaria 31
arresto di una corsa 93
assistenza tecnica 109
avvisi email 22

B

BaseSpace
  connessione 17
  credenziali 88
BlueFuse 29

C

caricamento dei reagenti
  PR2 50
caricamento per i reagenti
  cartuccia 51
cartella delle corse
  definizione 14
cartella InterOp 33
cartelle corsa
  denominazione 32
cartelle della corsa
  file analisi primaria 59
cartelle delle corse
  contenuti 33
  gestione 19
  temp, output, analisi 32
cartuccia di reagenti 9
cella a flusso
  colore tappo 44
  designatore lettere 97
  numerazione tile 60
  panoramica 7
  pulizia 44
  singola corsia 27
cicli in una lettura 28
CompletedJobInfo.xml 31
componenti
  cartuccia di reagenti 9
  cella a flusso 7
  modulo ottica 5
  scomparto dei reagenti 5
  scomparto della cella a flusso 5-6
  scomparto reagenti 8
connessione rete 96
copia di file e cartelle 19

D

documentazione 109
durata della corsa 27

E

eliminazione di file e cartelle 19

F

file manifest
  copiare sullo (verso lo) strumento 19
  definizione 14
flacone degli scarti 8
fluidica
  lavaggio 73, 77
  risoluzione dei problemi 99-100
flusso di lavoro 39
  durata della corsa 27

flusso di lavoro di analisi
definizione 14
flusso di lavoro VeriSeq
analisi secondaria 29
cella a flusso 44
frequenza di manutenzione 63
ripetizione analisi in locale 22
foglio campioni
copiare sullo (verso lo) strumento 19
definizione 14
modifica 52
nella cartella della corsa 59
non trovato 96

G

generazione della griglia 27
generazione di cluster 39
generazione griglia identificazione cluster 58
genoma di riferimento
formato file 14
guida, funzione Live Help (Assistenza in diretta) 90
guida, tecnica 109

I

icona di avviso di stato 18
icone
avviso di stato 18
errori e avvertenze 18
indicatori di attività 17
sensore 17
impostazione dello strumento 26
impostazioni della rete 87
impostazioni di sistema 87
indicatori di attività 17
indicatori di rilevamento 17
indirizzo IP 87
inizializzazione 96
interruttore di alimentazione 13

L

lavaggi
benefici dei 62
impostazioni lavaggio post-corsa 22
manutenzione 65, 73
post-corsa 67
preparazione allo spegnimento 81
preparazione allo stato inattivo (idle) 77
standby 65, 77
volumi attesi 104
lavaggio di manutenzione 65, 73
lavaggio di standby 65, 77
lavaggio linea templato 67
lavaggio post-corsa 67
linee guida acqua da laboratorio 12
Live Help (Assistenza in diretta) 90
lunghezza lettura 27-28

M

maniglia del pettine di aspirazione 8
materiali di consumo
acqua da laboratorio 12
forniti da Illumina 10
forniti dall'utente 11
materiali di consumo forniti dall'utente 11
MiSeq Reporter 2
credenziali 88
panoramica 31
MiSeq Self-Service 97
modulo ottica 5
monitoraggio della corsa 56
morsetto della cella a flusso 6

N

nome account di sistema 88
nome dominio 87-88
nome utente 13
numerazione tile 60

O

opzioni corsa 22

P

password 13
password, modifica 88
percorsi cartelle
per la corsa attuale 54
PGS 44
porre lo strumento in stato inattivo (idle) 77
portata, risoluzione dei problemi 99

posizione cartelle
impostazioni predefinite 22
PR2, caricamento 50

R

raggruppa log 21, 84-85
reagenti
caricamento 50
in kit 10
RFID
cartuccia dei reagenti 51
monitoraggio 2
PR2 50
risoluzione dei problemi 97
riavvio del software (reboot) 26
ricette, gestione 19
riferimenti genomici 19
risoluzione dei problemi
errori impostazione corsa 96
file specifici per la corsa per 84
fluidica 100
portata 99
raggruppa log 21, 84-85
RFID 97
RTAcomplete.txt 59
RunInfo.xml 33, 59
runParameters.xml 33

S

schermata impostazione corsa 43
schermata Sequencing (Sequenziamento) 56
schermata Welcome (Benvenuto) 16
schermate impostazione corsa 19
scomparto della cella a flusso 5-6
scomparto reagenti 5, 8
sensore sportello cella a flusso 17
sequenziamento 39
software
aggiornamento 80
durata della corsa 27
impostazione dello strumento 26
inizializzazione 13
sullo strumento 15
updating 80
verifica spazio su disco 35
sospensione di una corsa 92
spazio su disco
spazio su disco insufficiente 96
verifica 35
spegnimento dello strumento 26, 81
spostamento di file e cartelle 19
status.xml 59

T

test volume 100

U

updating software 80

V

vano refrigerato dei reagenti, temperatura 17
Visualizzatore analisi di sequenziamento (SAV) 27, 56
volumi lavaggio 104

W

Windows, ridurre a 26

Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Tabella 5 Dati di contatto generali Illumina

Indirizzo	5200 Illumina Way San Diego, CA 92122 U.S.A.
Sito Web	www.illumina.com
Email	techsupport@illumina.com

Tabella 6 Numeri di telefono Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Numero di contatto	Area geografica	Numero di contatto
Nord America	1.800.809.4566	Italia	800.874909
Austria	0800.296575	Norvegia	800.16836
Belgio	0800.81102	Paesi Bassi	0800.0223859
Danimarca	80882346	Regno Unito	0800.917.0041
Finlandia	0800.918363	Spagna	900.812168
Francia	0800.911850	Svezia	020790181
Germania	0800.180.8994	Svizzera	0800.563118
Irlanda	1.800.812949	Altri paesi	+44.1799.534000

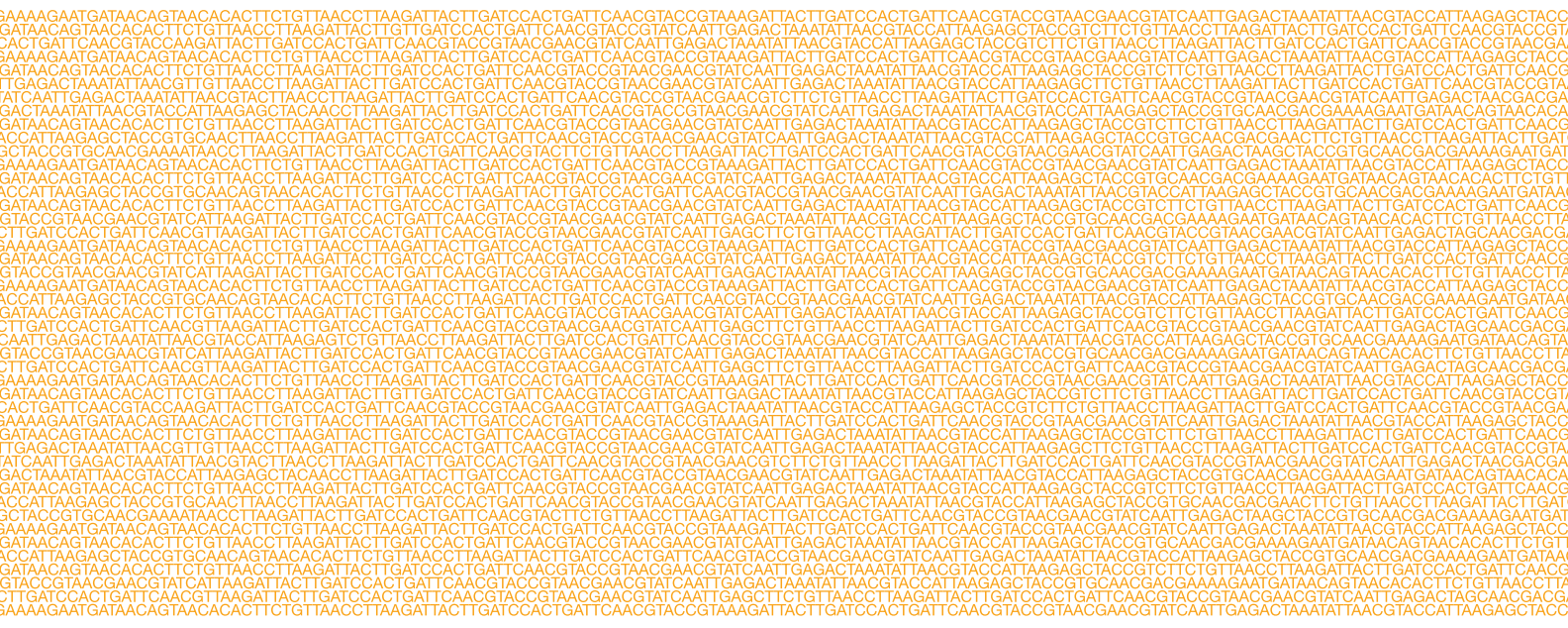
Schede di sicurezza

Le schede di sicurezza (SDS) sono disponibili sul sito Web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sds.ilmn.

Documentazione dei prodotti

La documentazione dei prodotti in formato PDF può essere scaricata dal sito Web Illumina. Andare al sito support.illumina.com e selezionare un prodotto, quindi fare clic su **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).

N. codice 15027617 Rev. O ITA



Illumina
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com